

Aus dem Zentrum für translationale Knochen-, Gelenk- und Weichgewebeforschung
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Michael Gelinsky

Untersuchungen zur Resorption von biomimetisch mineralisiertem Kollagen unter
besonderer Berücksichtigung der Aktivität osteoklastenspezifischer Enzyme

D i s s e r t a t i o n s s c h r i f t

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus
der Technischen Universität Dresden

von

Kathleen Koperski

aus Lauchhammer

Dresden 2015

1. Gutachter: Prof. Dr. M. Gelinsky

2. Gutachter: Prof. Dr. A. Rösen-Wolff

Tag der mündlichen Prüfung: 21.06.2016

Vorsitzender der Prüfungskommission: Prof. Dr. Dr. G. Lauer

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	9
Abbildungsverzeichnis	11
Tabellenverzeichnis	13
1. Einleitung und Zielstellung	15
2. Grundlagen	19
2.1. Knochen	19
2.2. Osteoklasten	19
2.3. Resorption und Remodelling	21
2.4. Enzyme der Osteoklasten	25
2.4.1. TRAP	25
2.4.2. Carboanhydrase II	26
2.4.3. Kathepsin K	26
2.5. Einsatz von mineralisiertem Kollagen für Modellstudien an Osteoklasten	27
3. Material und Methoden	31
3.1. Chemikalien und Reagenzien	31
3.2. Präparation der Monozyten	33
3.3. Herstellung des mineralisierten Kollagentapes	34
3.4. Herstellung von Kollagengel	36
3.5. Herstellung von Alginatgel	36
3.6. Herstellung von <i>bone chips</i>	36
3.7. Weitere Zellkulturtechniken	37
3.7.1. Kultivierung von Monozyten mit osteoklastärer Stimulation auf verschiedenen Materialien	37
3.7.2. Kryokonservierung von Zellen	37
3.7.3. Fixieren von Zellen	37
3.8. Vorbereitung der Proben für mikroskopische Analysen	38
3.8.1. Präparation der Tapes für die Rasterelektronenmikroskopie und anschließende mikroskopische Untersuchung	38
3.8.2. TRAP-Färbung und mikroskopische Untersuchung der Proben	38
3.8.3. Fluoreszenzfärbung und mikroskopische Untersuchung der Proben	39
3.9. Biochemische Analyseverfahren	39
3.9.1. Messung des DNA-Gehalts	40
3.9.2. Messung der TRAP-Aktivität	41

3.9.3. Messung der CAII-Aktivität	41
3.9.4. Messung der Kathepsin K-Aktivität	41
3.10. Statistik	41
4. Ergebnisse und Diskussion	43
4.1. Charakterisierung der präparierten Monozyten	43
4.2. Untersuchung zur Besiedlungszellzahl	47
4.3. Untersuchung zur Vorbehandlung der Tapes mit hiFCS-haltigem Medium	53
4.4. Untersuchung zum Einfluss des HA-Gehaltes der mineralisierten Kollagentapes auf die Osteoklastogenese	57
4.5. Einfluss der Oberflächenbeschaffenheit auf die Osteoklastogenese	61
4.6. Einfluss des Spenders auf die Osteoklastogenese	67
4.7. Einfluss des Poolens von Zellen verschiedener Spender auf die Osteoklastogenese	69
4.8. Einfluss des pH-Wertes auf die Osteoklastogenese	71
4.9. Einfluss des Kultivierungsmediums auf die Osteoklastogenese	87
4.10. Osteoklastogenese auf anderen Biomaterialien	95
5. Zusammenfassung	105
6. Summary	109
7. Literaturverzeichnis	113
A. Danksagung	I
B. Erklärungen zur Eröffnung des Promotionsverfahrens	III
C. Bestätigung zur Einhaltung gesetzlicher Vorgaben	V
D. Anhang	VII
D1. Einfluss des pH-Wertes auf die Osteoklastogenese	VII
D2. Einfluss des Kultivierungsmediums auf die Osteoklastogenese	X
D3. Osteoklastogenese auf anderen Biomaterialien	XI

Abkürzungsverzeichnis

αMEM	Alpha-Medium
ANOVA	<i>analysis of variance</i> (Varianzanalyse)
BSA	bovines Serumalbumin
CAII	Carboanhydrase II
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
CD	<i>Cluster of differentiation</i> , Oberflächenmerkmale von Zellen
CSK	Kathepsin K
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDC	N-Dimethylaminopropyl-N'-ethylcarbodiimid Hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGME	Ethylenglycolmonomethylether
FCS	<i>fetale calf serum</i>
HA	Hydroxylapatit
HA-Gehalt	Hydroxylapatitgehalt
HBSS	<i>Hanks Balanced Salt Solution</i>
hiFCS	hitzeinaktiviertes FCS
HS	Humanserum
LSM	<i>laser scanning microscope</i>
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes

Abkürzungsverzeichnis

PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
pNp	para-Nitrophenol
M-CSF	<i>Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
ml	<i>Milliliter</i>
RANKL	<i>Receptor Activator of NF-κB Ligand</i>
R_a	Rauigkeit
TRAP	tartratresistente saure Phosphatase
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Abbildungsverzeichnis

1.1. Prinzipien des <i>Tissue Engineering</i>	16
2.1. Osteoklastogenese aus hämatopoetischen Stammzellen	21
2.2. Funktionelle Organisation und Polarität eines Osteoklasten	22
2.3. Resorptionsprozess der Osteoklasten	24
2.4. Membranähnliches Tape aus mineralisiertem Kollagen	29
4.1. Mehrkernige Monozyten	44
4.2. Variation der Besiedlungszellzahl auf Polystyrol	49
4.3. Variation der Besiedlungszellzahl auf Tape	50
4.4. Messdaten zum Einfluss der Vorbehandlung der Tapes mit hiFCS-haltigem Medium	55
4.5. Messdaten zum Einfluss der Variation des HA-Gehalts auf die Osteoklastogenese	58
4.6. Fluoreszenzfärbung und REM-Aufnahme variierender Oberflächenrauigkeiten	63
4.7. Messdaten zum Einfluss der Variation der Oberflächenrauigkeit auf die Osteoklastogenese	64
4.8. Messdaten Spendervergleich	68
4.9. Messdaten zum Einfluss des Poolens von Zellen verschiedener Spender auf Tape	69
4.10. pH-Wert Verlauf des Mediums auf Tape	73
4.11. Kalzium im Überstand besiedelter Polystyrolproben	74
4.12. Kalzium im Überstand besiedelter und unbesiedelter Tapes	75
4.13. Messdaten zum Einfluss des pH-Wertes auf die Osteoklastogenese	76
4.14. TRAP-Aktivität im Überstand beziehungsweise im Lysat	78
4.15. TRAP-Färbung der Proben des pH-Experiments	81
4.16. Fluoreszenzbilder des pH-Experiments	83
4.17. Messdaten der CSK-Aktivität der Proben des pH-Experiments	84
4.18. TRAP-Färbung zum Einfluss des Kultivierungsmediums auf die Osteoklastogenese	90
4.19. Einfluss des Kultivierungsmediums auf die Osteoklastogenese A (Polystyrolproben)	91
4.20. Einfluss des Kultivierungsmediums auf die Osteoklastogenese B (Polystyrolproben)	92
4.21. Einfluss des Kultivierungsmediums auf die Osteoklastogenese (Tape)	93
4.22. Einfluss des Kultivierungsmediums auf die Osteoklastogenese (mineralisierte Kollagenmatrix)	94
4.23. Materialvergleich Polystyrol, Tape, Mineralisiertes Kollagen	96
4.24. Fluoreszenzfärbung von Osteoklasten auf einem <i>bone chip</i>	97
4.25. Fluoreszenzfärbung von Osteoklasten auf Kollagengel	98
4.26. Messdaten zur Osteoklastogenese auf Kollagengel	99
4.27. Vergleich des DNA-Gehalts <i>bone chips</i> und Gele DNA-Gehalt	101
4.28. Vergleich <i>bone chips</i> und Gele TRAP- und CAll-Aktivität	102

4.29. Vergleich <i>bone chips</i> und Gele CSK-Aktivität	103
D.1. pH-Experiment DNA-Gehalt	VII
D.2. pH-Experiment TRAP-Aktivität	VIII
D.3. pH-Experiment CAll-Aktivität	IX
D.4. Einfluss des Kultivierungsmediums auf die Osteoklastogenese (Tape, 3 Spender) . . .	X
D.5. CSK-Aktivität der Einzelspender im Materialvergleich	XI
D.6. Messdaten der Osteoklastogenese auf <i>bone chips</i> mit Angabe signifikanter Unterschiede	XII
D.7. Messdaten der kultivierten Osteoklasten auf Alginatgel und Kollagengel mit Angabe signifikanter Unterschiede	XIII

Tabellenverzeichnis

3.1. Chemikalien und Reagenzien	31
3.2. Übersicht Medien	33
3.3. Medien und Puffer für die Monozytenisolation und -kultivierung	34
3.4. Zusammensetzung Azetatpuffer	38
3.5. Zusammensetzung TRAP-Färbepuffer	38
3.6. Zusammensetzung der Lösungen für die Fluoreszenzfärbung	39
3.7. Puffer und Lösungen für biochemische Analyseverfahren	40
4.1. initiale Besiedlungszelldichten für humane Osteoklastenvorläuferzellen	48
4.2. Bikarbonatzusatz der pH-Medien	71
4.3. pH-Wert Studie unbesiedelter Proben	72
4.4. Zusammensetzung der Basalmedien für die Osteoklastogenese humaner PBMC	88
4.5. Zusammensetzung der getesteten Medien	89

1. Einleitung und Zielstellung

Vitales Knochengewebe ist ständigen Umbauprozessen unterworfen. Entsteht ein Defekt, wird der Knochen durch neugeformte Strukturen repariert. In diesen Prozess sind verschiedene Zelltypen involviert, darunter Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten (Teitelbaum, 2000a; Ross und Christiano, 2006; Zhang et al., 2012). In der Wiederherstellungs-Chirurgie ist Knochenersatz von großer Bedeutung, wenn schwere skelettale Schäden auftreten (Onoda et al., 2011). Auto- als auch Allotransplantationen von Knochengeweben sind aufgrund der guten osteoinduktiven und biochemischen Eigenschaften noch immer der Goldstandard (Parikh, 2002; Sen und Miclau, 2007; Zhang et al., 2012). Aufgrund der Knappheit der zur Verfügung stehenden muskuloskelettalen Spendermaterialien und der zugleich steigenden Anzahl von notwendigen Knochenmaterialtransplantationen wird vermehrt nach Materialersatz gesucht. Der ideale Knochenersatz ist biokompatibel, bioresorbierbar, dirigiert die Richtung der Knochenneubildung (osteokonduktiv), regt die Knochenneubildung an (osteoinduktiv), ist strukturell knochenähnlich, einfach anzuwenden und kosteneffektiv (Greenwald et al., 2001; Parikh, 2002; Chim und Schantz, 2005; Zhang et al., 2012).

Tissue Engineering ist ein interdisziplinäres Gebiet der Wissenschaft, welches die Prinzipien des Ingenieurwesens und der Biowissenschaften auf die Entwicklung biologischer Ersatzmaterialien anwendet, die für die Wiederherstellung, Erhaltung oder Verbesserung von Gewebe- oder Organfunktionen eingesetzt werden (Langer, 1993; Nerem und Sambanis, 1995). Langfristig sollen für die Implantation geeignete Systeme entwickelt oder *in vivo* Geweberemodelling ermöglicht werden. Hauptkomponente des *Tissue Engineering* ist der Einsatz lebender Zellen und/oder extrazellulärer Matrixbestandteile in der Entwicklung solcher Systeme und Konstrukte, die implantiert zur Wiederherstellung oder zum Ersatz der biologischen Funktionen führen. Um das biologische Verhalten der Konstrukte kontrollieren zu können, erfordert die Entwicklung das Verständnis der Struktur-Funktions-Beziehung von Zellen, Geweben und Organen. Die extrazelluläre Matrix der biologischen Systeme ist ebenfalls von großer Bedeutung, da sie ihre mechanischen Eigenschaften bestimmt. Chemische und strukturelle Stabilität sind weitere notwendige Eigenschaften, um das Überleben der Zellen nach der Implantation in der *in vivo* Umgebung zu gewährleisten (Nerem und Sambanis, 1995). Denkansätze im *Tissue Engineering* beinhalten die Nutzung von Scaffolds, Zellen und deren Kombination. Häufigster Ansatz ist der Einsatz resorbierbarer oder biologisch abbaubarer Scaffolds, die an die Umgebung des lebenden Gewebes angepasst sind und mit lebenden Zellen besiedelt werden können. Die Zellen proliferieren und organisieren sich in der dreidimensionalen Struktur des Scaffolds und beginnen mit der Produktion adäquater extrazellulärer Matrix. Während der Formierung, Ablagerung und Organisation der neu generierten Matrix wird die Startmatrix des Scaffolds abgebaut, resorbiert und metabolisiert (Nerem und Sambanis, 1995; Stock und Vacanti, 2001). Die Zellen differenzieren sich auf dem Scaffold zu den gewünschten Organ- beziehungsweise Gewebezellen bevor die *in vitro* besiedelten Matrizen implantiert werden. Am Ende des Prozesses ist ein lebendes Gewebe oder Organ entstanden, welches die Funktion des Gewebes/Organs im Körper erhält, wieder herstellt oder verbessert. Das Risiko immunologischer Abwehrreaktionen, ebenso wie das Risiko viraler Infektionen wird beim *Tissue En-*

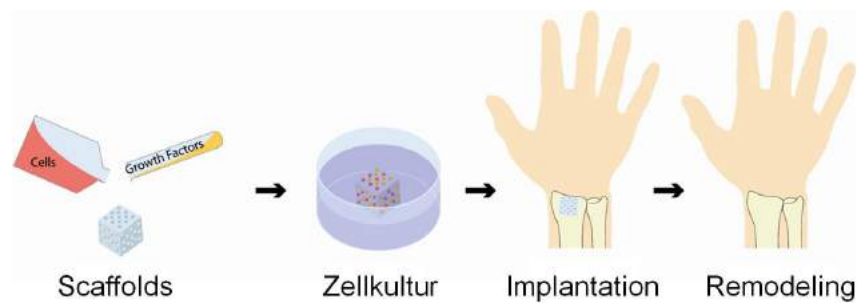


Abbildung 1.1.: *Tissue Engineering* beinhaltet die Applikation metabolisch aktiver Zellen auf unterstützenden dreidimensionalen Scaffolds unter kontrollierter Verabreichung von Wachstumsfaktoren, um die Generation vitaler Transplantatmaterialien für funktionalen Gewebeersatz zu erreichen (Abbildung aus (Drosse et al., 2008)).

gineering durch den Einsatz autologer Spenderzellen umgangen. Die eingesetzten Scaffolds müssen zudem biokompatibel sein und den nutritiven als auch biologischen Ansprüchen der spezifischen Zellpopulation gerecht werden, die in der Gewebeformation involviert ist (Stock und Vacanti, 2001). Ein weiterer Ansatz ist es, Zellen von biologischer Matrix enzymatisch oder durch Detergenzien zu entfernen und diese dezellularisierte Matrix anschließend zu verwenden. Es handelt sich dabei um allogenes oder xenogenes Gewebe. Diese Matrix ist dann theoretisch biologisch abbaubar beziehungsweise resorbierbar und müsste sich gut für die Besiedlung mit Zellen eignen. Alternativ werden artifizielle Matrizen im *Tissue Engineering* eingesetzt (Stock und Vacanti, 2001; Heinemann et al., 2011). In Abbildung 1.1 ist das Prinzip des *Tissue Engineering* dargestellt (Drosse et al., 2008).

Bei der Therapie von Knochendefekten in lasttragenden Regionen werden häufig nichtresorbierbare Materialien wie Metalle und Keramiken eingesetzt (Navarro et al., 2008). Der Einsatz von resorbierbaren Materialien ist erstrebenswert, da sich diese nach der Transplantation in den Prozess des Knochenremodellings integrieren und somit mit der Zeit durch körpereigenes Material ersetzt werden (Hutmacher, 2000; Boccaccini und Maquet, 2003; Navarro et al., 2008). Damit erlangt der Knochen langsam seine natürlichen biomechanischen Eigenschaften zurück (Baron, 1995; Teitelbaum, 2000b). Wichtig ist jedoch, dass die Resorption und der Ersatz durch körpereigenes Knochenmaterial ausgewogen stattfinden, sodass die mechanische Stabilität des Gewebes gewährleistet ist. Daher sind Untersuchungen zur Resorption von Biomaterialien von großer Bedeutung, bevor diese in der Klinik *in vivo* zum Einsatz kommen (Zhang et al., 2012).

Osteoklasten sind für die Resorption von Knochen verantwortliche Zellen, weshalb sie in Zellexperimenten zur Untersuchung von Resorption eingesetzt werden. Typische Untersuchungsmethoden zum Nachweis von osteoklastärer Aktivität sind die Feststellung von Vielkernigkeit, die genanalytische Bestimmung von tartratresistenter saurer Phosphatase 5b (TRAP 5b) (Minkin, 1982; Ek-Rylander et al., 1991; Ljusberg et al., 2005; Detsch et al., 2010b), Carboanhydrase II (CAII) (Lehenkari et al., 1998; Detsch et al., 2010b; Schilling et al., 2004), Kathepsin K (Bossard et al., 1996; Littlewood-Evans et al., 1997; Votta et al., 1997; Söderström et al., 1999; Dodds et al., 2001; Ljusberg et al., 2005), des Kalzitoninrezeptors und des Vitronektinrezeptors (Detsch und Boccaccini, 2014; Blair, 1998; Schilling et al., 2004). Die enzymatische Messung von TRAP 5b (Halleen et al., 2000; Janckila et al., 2001) und CAII (Detsch et al., 2010a) und die Bestimmung der Kalziumkonzentration im Überstand der Zell-

kulturen (Neutzsky-Wulff et al., 2010; Reichert et al., 2013) sind weitere Marker, die zur Beschreibung osteoklastärer Zelldifferenzierung genannt wurden. Zudem können Kollagenspaltprodukte im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden (Karsdal et al., 2003; Neutzsky-Wulff et al., 2010). Eine weitere große Rolle bei Resorptionsuntersuchungen an Biomaterialien spielt die Analyse von Resorptionspits.

Allerdings gibt es hierbei einige Nachteile. Die mikroskopische Beurteilung der Resorptionslakunen ist sehr zeitaufwändig und kostenintensiv. Zudem ist eine sehr geringe Rauigkeit des eingesetzten Materials nötig, um die Resorption mikroskopisch anhand von Resorptionslakunen zu quantifizieren, da die Messmethoden die resorbierte Fläche und das resorbierte Volumen relativ zur originalen Oberflächenbeschaffenheit ermitteln. Ideal ist hierbei eine Rauigkeit von unter 1 μm (Zhang et al., 2012) damit zwischen bereits vorher existierenden strukturellen Unebenheiten und neu entstandenen Pits unterschieden werden kann. Zudem können bisher bekannte Resorptionsassays nur die Resorption auf glatten Knochenstrukturen imitieren. Im Körper machen hingegen der trabekuläre oder spongiöse Knochen den größten Anteil aus, allerdings sind solche Strukturen *in vitro* schwer zu imitieren und Resorptionsstudien dazu sind noch nicht sehr zuverlässig (Zhang et al., 2012). Auf unregelmäßigen oder porösen Materialien können bisher noch keine quantifizierenden Aussagen über die Resorption gemacht werden.

Die Motivation dieser Arbeit war es, biochemische Verfahren für die Quantifizierung von osteoklastärer Resorption zu entwickeln. Während die biochemischen Messungen der Aktivitäten von TRAP 5b und CAII bereits als osteoklastäre Marker eingesetzt werden, sollte hier erstmals die enzymatische Aktivität von Kathepsin K biochemisch bestimmt werden. Dazu wurden Osteoklasten auf verschiedenen Materialien kultiviert und untersucht. Durch biochemische Analyse sollten dann Rückschlüsse auf die Resorptionsaktivität der Zellen gezogen werden. Das Fernziel dieser Arbeit ist, das Resorptionsverhalten von Osteoklasten auf Biomaterialien zu quantifizieren, sodass die zeit- und kostenintensive mikroskopische Beurteilung ersetzt werden kann. Ein Schritt auf dem Weg zu diesem Ziel ist es, die Osteoklastogenese auf den Modellsubstraten genauer zu untersuchen und herauszufinden, wie die *in vitro* Resorption auf den verschiedenen Substraten beeinflusst werden kann. Die gemessenen Enzymaktivitäten sollten schließlich mit der Resorptionsaktivität der Osteoklasten in Korrelation gebracht werden.

2. Grundlagen

2.1. Knochen

Knochen besteht zu 20 bis 25 % aus Wasser, zu 25 bis 30 % aus organischen Substanzen und etwa 50 % werden von anorganischen Substanzen gebildet. Extrazelluläre Matrix des Knochengewebes ist reich an Kollagenfibrillen. Kollagen, nicht-kollagene Proteine sowie andere organische Bestandteile werden von der mineralischen Phase des Knochens durchdrungen. Dabei handelt es sich vor allem um Kalziumkarbonat, Kalziumsulfat und Kalziumphosphat (Hydroxylapatit). Die Minerale sind in kristalliner Form angeordnet, spindelförmig oder plattenartig eingebettet (Drake et al., 1996; Faller et al., 2004; Ross und Pawlina, 2003). Dadurch entsteht ein Gewebe mit guter physikalischer Festigkeit und somit unterstützenden und schützenden Eigenschaften, die maßgebend für die physiologischen Funktionen des Knochens sind. Die biologische Verformbarkeit wird durch eine außerordentlich gute Blutversorgung erreicht, die für den nötigen metabolischen Austausch sorgt. Das rigide, extrem harte knöcherne Material ist eine lebende Substanz, welche einfach an die sich verändernden statische Bedingungen im Körper adaptieren kann, zum Beispiel an Veränderungen in der Richtung der Stresswirkung (Faller et al., 2004).

Etwa 90 % der Knochenmatrix werden von den Kollagenen Typ I und Typ V gebildet. Hauptkomponente dabei stellt das Kollagen Typ I dar (Delaissé et al., 2003; Aguda et al., 2014), Typ V macht einen kleineren Anteil aus. Zudem enthält die Knochenmatrix weitere Proteine und auch Glykosaminoglykane (Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat und Keratinsulfat), kleine Glykoproteine (Osteokalzin, Osteonektin, Osteopontin) sowie verschiedene Sialoproteine. Die Glykoproteine und Sialoproteine auf der Grundsubstanz spielen eine Rolle in der Bindung von Kalzium während des Mineralisierungsprozesses. Durch die Variation des Mineralisierungsgrades wirkt Knochen als Reservoir für Kalzium und Phosphat. Kalzium- als auch Phosphationen können aus dem Knochen mobilisiert und vom Blut aufgenommen werden, welches sie dann im Körper verteilt. Somit hat Knochen, neben seiner stabilisierenden und schützenden Eigenschaft, auch eine Rolle in der Regulation des Kalziumgehaltes im Blut (Drake et al., 1996; Ross und Pawlina, 2003; Bar-Shavit, 2007).

2.2. Osteoklasten

Das Wort 'Osteoklast' setzt sich zusammen aus den griechischen Worten für 'Knochen' und 'Brechen' (Detsch und Boccaccini, 2014). Osteoklasten wurden erstmals 1873 von Albert Kölliker benannt (von Kölliker, 1873; Detsch und Boccaccini, 2014). Es handelt sich um phagozytierende Zellen auf Knochenoberflächen, überall dort, wo Knochen abgebaut, umgeformt und reorganisiert wird oder beschädigt wurde (Ross und Pawlina, 2003). Osteoklasten sind Zellen hämatopoetischen Ursprungs. Einkernige Vorläuferzellen finden sich im Knochenmark und im peripheren Blut. Diese fusionieren und differenzieren zu multinuklearen Zellen (Vignery, 2000; Wilson und Trumpp, 2006; Bar-Shavit, 2007;

Zaidi, 2007; Chambers, 2010; Detsch und Boccaccini, 2014). Die Zellfusion ist ein charakteristisches Merkmal von Osteoklasten. Dadurch wird ein Zelldurchmesser von bis zu 300 μm erreicht. Diese Größe ermöglicht dem Osteoklasten eine relativ große Matrixfläche zu bedecken und an ihr anzuheften. Verglichen dazu haben Makrophagen einen Zelldurchmesser von etwa 20 μm (Bar-Shavit, 2007). Osteoklasten sind die einzigen Zellen des menschlichen Körpers, die zur Knochenresorption fähig sind, ein Prozess, bei dem die organische und die mineralische Phase des Knochens aufgelöst werden. Durch ihre Größe können sie diese Aufgabe besonders effizient ausführen (Ross und Pawlina, 2003; Bar-Shavit, 2007). Osteoklasten spielen somit eine wichtige Rolle im natürlichen Umbauprozess des Knochens (Detsch und Boccaccini, 2014). Normale Osteoklasten von Säugetieren haben zwischen 3 und 20 Kerne pro Zelle. Osteoklasten von Patienten mit *Pagets Disease* hingegen können bis zu 100 Kerne beinhalten (Vignery, 2000; Roodman und Windle, 2005).

Zwei Wachstumsfaktoren sind für die Entwicklung von Osteoklasten essenziell. Dabei handelt es sich um den Makrophagen stimulierenden Faktor (M-CSF) und um den Rezeptor Aktivator des NF- κB Liganden (RANKL). M-CSF ist unverzichtbar für die Proliferation und Differenzierung von Osteoklastenvorläufern sowie für das Überleben mehrkerniger Osteoklasten. M-CSF bindet an seinen Rezeptor, c-Fms, auf Vorläuferzellen der Osteoklasten und gibt ihnen somit Signale zum Überleben und für ihre Differenzierung. Für die Osteoklastogenese ist zudem der Kontakt zwischen Vorläuferzellen und Stromazellen oder Osteoblasten nötig. Durch RANKL werden die durch M-CSF stimulierten Zellen angeregt den Osteoklasten-Phänotyp zu exprimieren (Udagawa et al., 1990; Scheven et al., 1997; Teitelbaum, 2000a). Osteoprotegerin (Antagonist Rezeptor für RANKL), welches von Osteoblasten sezerniert wird, kann dieses Signal inhibieren (Karst et al., 2004; Detsch und Boccaccini, 2014).

Für *in vitro* Studien ist es möglich Osteoklasten aus Vorläuferzellen, genauer aus $\text{CD } 14^{+}/\text{CD } 16^{-}$ Monozyten, zu generieren. Natives Knochengewebe, Knochenmark, peripheres Blut sowie Leukozytenkonzentrate (*buffy coats*) können für die Isolation mononuklearer Vorläuferzellen genutzt werden (Monchau et al., 2002; Schilling et al., 2004; Fong et al., 2013; Detsch und Boccaccini, 2014). Auch Zelllinien, wie die humane Monozyten Zelllinie U-937, können zur Bildung aktiv resorbierender Zellen stimuliert werden (Blotti  re et al., 1995; DiCosmo-Ponticello et al., 2014). Diese Zellen werden in einem Standardmedium kultiviert und adhärieren spontan. Durch die Zugabe von Vitamin D differenzieren die Zellen von U-937 dann zu Riesenzellen.

Eine weitere Zelllinie, die sich für Resorptionsstudien eignet, ist RAW 264.7. Dabei handelt es sich um eine Maus-Leukämie Monozyten-Makrophagen Zelllinie, die aus tumorinduzierter Aszites männlicher Mäuse (durch intraperitoneale Injektion des Abselon Leukämie Virus) gewonnen werden. Diese Zellen werden anschließend durch M-CSF und RANKL stimuliert, um zu Osteoklasten zu differenzieren, weshalb sie gut für *in vitro* Studien der Osteoklastenbildung und -aktivierung eingesetzt werden können (Wei et al., 2001). Bereits nach 14 Tagen der Kultivierung unter M-CSF und RANKL formen sie multinukleare Riesenzellen (Detsch und Boccaccini, 2014).

In Abb.2.1 ist die Rolle von Zytokinen, Hormonen, Steroiden und Prostaglandinen bei der Osteoklastogenese aus hämatopoetischen Stammzellen dargestellt (Ross und Christiano, 2006).

Für Experimente zur Untersuchung der Osteoklastogenese *in vitro* werden Dentin und kortikaler Knochen als Substrate eingesetzt (Boyde et al., 1984; Kakudo et al., 1996; Cody et al., 2011). Diese Oberflächen eignen sich zudem auch für Resorptionsassays, um die Effekte und therapeutischen Profile von Medikamenten wie Biophosphonaten an Osteoklasten zu untersuchen (Susa et al., 2004; Zhang et al., 2012).

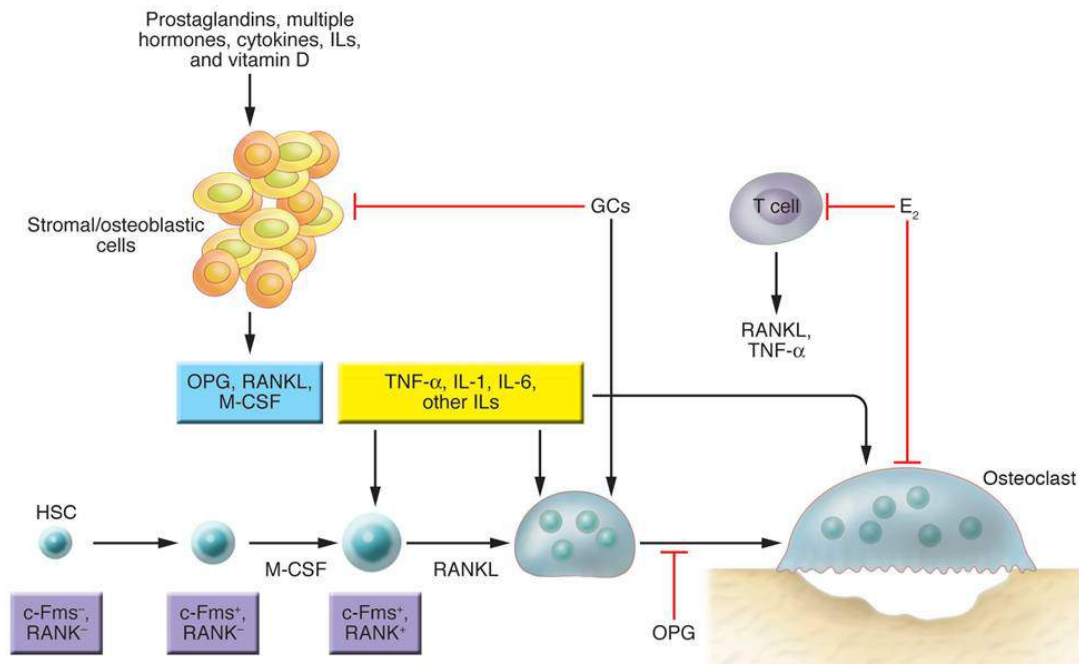


Abbildung 2.1.: Osteoklastogenese aus hämatopoetischen Stammzellen (Abbildung aus Ross, 2006).

2.3. Resorption und Remodelling

Der Prozess der Osteoklastenentwicklung beinhaltet das Anheften an die Knochenoberfläche, die Migration und den folgenden Abbau von Knochenmatrixkomponenten, während Osteoklasten mit typischen extrazellulären Proteinen interagieren, z.B. Fibronektin, Kollagen, *bone sialoprotein* und Osteopontin (Grano et al., 1994; Faccio et al., 1998; Detsch und Boccaccini, 2014). Die Interaktion zwischen Osteoklast und Knochenoberfläche wird durch Podosomen vermittelt, fokale Kontakte, die F-Aktin, Talin und Vinkulin enthalten (Detsch und Boccaccini, 2014).

Die Resorption von Knochengewebe ist eine Kaskade von Prozessen während der ein Osteoklast zur Resorptionsseite migriert, sich an die Knochenoberfläche anheftet, die anorganische und organische Phase der Knochenmatrix auflöst, sich wieder von der Oberfläche ablöst und zu einem nächsten Resorptionsbereich weiterzieht oder apoptotisch wird (Blair, 1998; Teitelbaum, 2000a; Bar-Shavit, 2007; Detsch und Boccaccini, 2014). Damit Knochenresorption stattfinden kann, müssen also beide Komponenten des Knochens abgebaut werden, das Hydroxylapatit, oder Mineral, und auch die Proteinmatrix. Die Matrix besteht primär aus Typ I Kollagen, aber beinhaltet auch eine Anzahl nichtkollagener Proteine, wie z.B. Osteokalzin, Osteopontin und *bone sialoprotein*. Osteoklasten befestigen sich eng an die Knochenoberfläche und formen ein extrazelluläres Kompartiment. In diesem abgegrenzten Raum kann ein niedriger pH-Wert generiert werden, welcher die Demineralisierung der Matrix fördert (Votta et al., 1997). Die Resorption extrazellulärer Matrix findet sowohl intra- als auch extrazellulär statt. Initial wirken Kollagenasen extrazellulär unter neutralem pH-Wert an Kollagenfibrillen, wodurch die Kollagenmoleküle individuell in spezifische Fragmente gespalten werden. Die Osteoklasten neh-

men diese Fragmente auf und vervollständigen den Abbau des Kollagens intrazellulär durch lysosomale Cysteinproteinasen (Söderström et al., 1999).

Osteoklasten weisen im Bereich des direkten Kontakts zum Knochen eine polarisierte Morphologie auf (siehe Abb. 2.2). Die der Matrix zugewandten Membrandomäne besteht zum einen aus einer zentralen Region mit vielen Plasmamembraneinfaltungen, die mikrovilliähnliche Strukturen formen, die sogenannte *ruffled border* oder Bürstensaummembran. Zum anderen entwickeln die Zellen einen ringähnlichen Umkreis aus Zytoplasma, die sogenannte *clear zone*, welche den Knochenbereich abgrenzt, der resorbiert werden soll. Die *sealing zone* umgibt die Bürstensaummembran, ist eng mit der Knochenoberfläche verbunden und bildet mit ihr eine feste Abdichtung zur Knochenmatrix (Ross und Pawlina, 2003). Innerhalb der *ruffled border* und in nächster Nähe befinden sich viele Mitochondrien und Lysosomen. Die gegenüberliegende Membrandomäne kann in die basolaterale und die funktional sekretorische Domäne eingeteilt werden (Baron, 1995; Ross und Pawlina, 2003; Mulari et al., 2003; Väänänen, 2005).

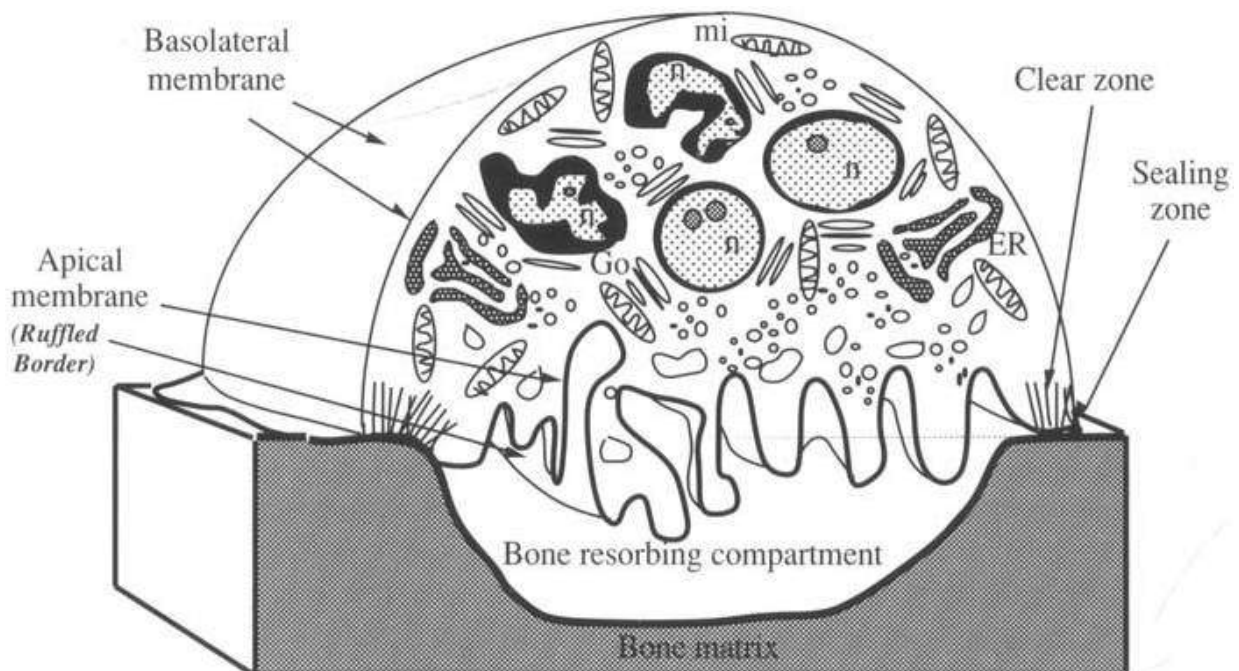


Abbildung 2.2.: Funktionelle Organisation und Polarität eines Osteoklasten; n = Nuklei; Gol = Gogiapparat; mi = Mitochondrium; ER = Endoplasmatisches Ritikulum (Abbildung aus Baron, 1995).

Ausgereifte Osteoklasten beginnen mit der Resorption durch peripheres Anheften an der Matrix, vermittelt durch das α_5/β_3 Integrin, wodurch ein Mikromillieu zwischen der *ruffled border* der Zelle und der Knochenoberfläche geschaffen wird. Wenn die Zellen sich polarisieren um mit der Resorption zu beginnen, entsteht eine scheibenähnliche Struktur, die durch einen einfachen Aktinring und einen doppelten Vinkulinring geschlossen wird. Diese Ringe sind Komponenten der *sealing zone*/Abdichtungszone und ihre Erscheinung kann als Marker für Osteoklasten verwendet werden (Väänänen, 2005).

Vor dem Abbau der organischen Komponenten, muss der Knochen zunächst dekalzifiziert werden. Der resorbierende Osteoklast dichtet mit Hilfe von *ruffled border* und *sealing zone* den Bereich zwischen sich und der Knochenoberfläche ab. In das entstandene extrazelluläre Kompartiment werden dann mit Hilfe von in der *ruffled border* lokalisierten Vakuolen-Typ-Protonen-ATPasen aktiv Protonen abgegeben, wodurch ein saurer pH-Wert generiert wird. Somit können pH-Werte von 4 bis 3 und weniger in dem Kompartiment generiert werden. Für die Löslichkeit von Hydroxylapatit sind pH-Werte von 4-4,5 essentiell (Vaananen et al., 2000; Detsch und Boccaccini, 2014). Somit kann der Osteoklast unter der Bürstensaummembran die Hydroxylapatitkristalle auflösen, wodurch der Knochen dekalzifiziert wird. Die Ansäuerung der Umgebung schafft außerdem einen optimalen pH-Wert für die Aktivität proteolytischer Enzyme (Silver et al., 1988; Blair et al., 1989; Väänänen et al., 1990), die von den Osteoklasten in den extrazellulären Spalt abgegeben werden. Diese Enzyme, welche unter anderem Kollagenasen enthalten, verdauen anschließend die organischen Komponenten der Knochenmatrix. Somit können letztlich sowohl die mineralisierte als auch die demineralisierte Matrix abgebaut werden (Baron et al., 1985; Bossard et al., 1996; Littlewood-Evans et al., 1997; Dodds et al., 2001; Detsch und Boccaccini, 2014). Lysosomale Cystein-Proteinasen spielen eine wichtige Rolle in der Resorption von Knochenmatrix. Kathepsin K ist eine osteoklastenspezifische Cystein-Proteinase, die eine grundlegende Rolle in der Degradierung von Knochenmatrix spielt, da sie Kollagen I spezifisch schneiden kann (Dodds et al., 2001).

Direkt unter dem rekrutierten Osteoklasten entsteht dadurch eine Resorptionslakune, die sogenannte 'Howship-Lakune' (Ross und Pawlina, 2003), begrenzt durch die Bürstensaummembran und die *sealing zone* (Dodds et al., 2001). Osteoklasten endozytieren die Abbauprodukte der Knochenmatrix aus der unterliegenden Resorptionslakune mit Hilfe der Bürstensaummembran, transportieren sie anschließend vesikulär durch die Zelle zur gegenüberliegenden freien Membran und sekretieren sie schließlich durch eine funktionell sekretorische Domäne (FSD) basolateral in den Extrazellulärraum (Salo et al., 1996, 1997; Halleen et al., 2000; Dodds et al., 2001; Detsch und Boccaccini, 2014). In den letzten Schritten der Resorption wird die Lakunenformation wieder aufgelöst, der Aktinring und die Vinkulinringe verschwinden. Die Zelle ist nun wieder bereit sich zu bewegen und einen neuen Resorptionszyklus zu starten (Detsch und Boccaccini, 2014).

Abbau und Aufbau von Knochenmatrix stehen im Körper in engem Zusammenhang und werden unter dem Begriff *Remodelling* zusammengefasst. Das *Remodelling* des menschlichen Skeletts ist ein stetiger zyklischer Prozess, charakterisiert durch Knochenabbau durch Resorption und Knochenaufbau. Verantwortlich für den Resorptionsprozess sind Osteoklasten, wohingegen die Neubildung von Knochensubstanz durch die Osteoblasten stattfindet (Bossard et al., 1996).

Nach erfolgter Resorption der Knochenmatrix werden Osteoblasten zu dieser Stelle rekrutiert, welche mit der Anlagerung neuer Proteinmatrix beginnen, die nachfolgend mineralisiert wird (Bossard et al., 1996). Verschiedene Signale regulieren den Prozess des *Remodellings* während der Entwicklung, Frakturheilung und pathologischen Knochenverlustes. Eine besonders wichtige Rolle spielen dabei MCS-F, RANKL und VEGF (Detsch und Boccaccini, 2014). Der Remodellingprozess ist zudem wichtig für den Kalzium-Ionen-Fluss in und aus der extrazellulären Flüssigkeit, um ein angemessenes Kalziumlevel im Blut aufrecht zu erhalten (Bar-Shavit, 2007). In Abb. 2.3 ist der Resorptionsmechanismus von Osteoklasten dargestellt (Ross und Christiano, 2006).

[illegible]

Der Resorptionsprozess kann zusammenfassend mit den folgenden Schritten beschrieben werden (Bar-Shavit, 2007):

1. Fusion der mononuklearen Vorläufer zum Polykaryon und Ausrichtung auf die zu resorbierende Stelle
2. Anheftung an die mineralisierte Knochenmatrix, Reorganisation des Aktins, Formierung des Aktinrings und der Abdichtungszone (*sealing zone*)
3. Formierung der Bürstensaummembran (*ruffled border*), umgeben von der Abdichtungszone
4. Abgabe von Säure und sauren kollagenolytischen Enzymen in den Bereich nahe der Matrix, Abdichtungszone und Bürstensaummembran; dadurch Auflösung und Abbau organischer Matrix / Demineralisierung des Knochens
5. Beseitigung der Resorptionsprodukte aus den Resorptionslakunen durch Endozytose, anschließend Transzytose durch die Zelle und Sekretion der Produkte in die Zirkulation
6. Ablösung des Osteoklasten von der Matrix, Auflösung seiner polarisierter Struktur und Wanderung an eine andere Stelle oder Einleitung der Apoptose

2.4. Enzyme der Osteoklasten

2.4.1. TRAP

Tartratresistente saure Phosphatase (TRAP) ist eine Metallophosphoesterase und kommt in Osteoklasten und in einigen mononuklearen Preosteoklasten charakteristisch vor. Das eisenhaltige kationische Glykoprotein ist am osteoklastenvermittelten Knochenturnover beteiligt und wird als histo- und biochemischer Marker für Osteoklasten und Knochenresorption genutzt (Minkin, 1982; Ek-Rylander et al., 1991; Ljusberg et al., 2005). Im menschlichen Serum finden sich zwei Isoformen der tartratresistenten sauren Phosphatase, TRAP 5a und 5b. Strukturell und antigenetisch sind beide identisch, allerdings enthält Typ 5a Sialinsäure, Typ 5b hingegen nicht. Das pH-Optimum von beiden Isoenzymen unterscheidet sich grundlegend. TRAP 5a hat ihr pH-Optimum bei etwa 4,9, der optimale Bereich für TRAP 5b liegt zwischen 5,5 und 6,0. TRAP 5b ist hochaktiv bei einem pH-Wert von 6,1, wohingegen TRAP 5a bei diesem pH-Wert nahezu inaktiv vorliegt. In Osteoklasten und in einigen aktivierten Makrophagen, beispielsweise in Alveolarmakrophagen der Lunge, werden große Mengen an TRAP exprimiert. Elektrophoretische Untersuchungen lassen annehmen, dass TRAP 5b von Osteoklasten stammt und TRAP 5a von einer anderen, bisher nicht genau bekannten Quelle. Es gibt noch zwei andere Formen von TRAP, welche von Blutplättchen und Erythrozyten exprimiert werden und andere Eigenschaften aufweisen, als die TRAP5a oder b (Halleen et al., 2000).

Vesikel, die TRAP enthalten, fusionieren mit den transzytotischen Vesikeln der Osteoklasten während des Resorptionsprozesses. Die TRAP produziert dann reaktive Sauerstoffspezies um die Matrixabbauprodukte weiter zu degradieren (Halleen et al., 1999). Basierend auf dieser Erkenntnis scheint es, dass die TRAP durch die Zelle transportiert und gemeinsam mit den Vesikeln an der basolateralen Seite durch die funktional sekretorische Domäne (FSD) abgegeben wird, zusammen mit den

resultierenden Fragmenten des Knochenabbaus, wie beispielsweise Kollagenfragmenten. Scheven et al. haben gezeigt, dass die Abgabe von Kollagenfragmenten mit der Sekretion von TRAP durch Osteoklasten während der Knochenresorption korreliert (Scheven et al., 1997). Folglich korreliert die von den Osteoklasten freigesetzte Menge an TRAP mit der resorbierten Menge an Knochen, was die TRAP zu einem potentiell nützlichen Resorptionsmarker im Serum macht. Zudem steigt die TRAP-Aktivität von Osteoklasten auf Knochen im Medium, wenn sie durch Parathormon oder Calcitriol (aktives Vitamin D₃) zur Resorption angeregt werden (Minkin, 1982). TRAP 5b ist ein spezifischer und sensitiver Marker für die Überwachung von antiresorptiven Therapien (Halleen et al., 2000).

2.4.2. Carboanhydrase II

Die Carboanhydrase II (CAII) ist ein frühes charakteristisches Enzym für osteoklastäre Differenzierung und seine Aktivität ist essenziell für optimale Knochenresorption (Kenny, 1985; Hall und Kenny, 1987; Lehenkari et al., 1998). Es gehört zur Familie der zytosolischen Enzyme und wurde in der Bürstensaummembran der Osteoklasten lokalisiert (Silverton et al., 1987). Das Enzym katalysiert die Bildung von Wasserstoff- und Bikarbonationen aus Wasser und Kohlenstoffdioxid. Die dadurch generierten Protonen werden anschließend in die Resorptionslakune gepumpt, wodurch ein saures Milieu entsteht. Das Hydrogenkarbonat wird durch Chlorid an der glatten Zellseite, also knochenmatrixfern, unter Beteiligung des Anionenaustauschers 2 (AE2) ausgetauscht (Drenckhahn und Kugler, 2002). Eine *in vivo* Mutation des CAII-Gens inhibiert die Knochenresorption und führt zu Osteopetrose (Sly et al., 1983; Lehenkari et al., 1998; Detsch und Boccaccini, 2014). Das Enzym fungiert außerdem als Mediator für Hormone, welche Knochenresorption und Osteoklastenbildung stimulieren (Gay und Mueller, 1974; Lehenkari et al., 1998).

2.4.3. Kathepsin K

Kathepsin K gehört zur Papain Superfamilie der Cystein Proteasen. Das Enzym wird vor allem von Osteoklasten exprimiert und konnte in aktiv resorbierenden Zellen immunhistochemisch angefärbt werden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass es im Bereich der Bürstensaummembran lokalisiert ist und dort hoch exprimiert wird. Die Kathepsine B, L und S findet man hingegen nur geringfügig in Osteoklasten. (Littlewood-Evans et al., 1997; Dodds et al., 2001; Ljusberg et al., 2005; Novinec und Lenarčič, 2013). In Säugerzellen werden Cystein-Proteinase als Vorläufermoleküle produziert. Sie werden dann entweder als Proenzym sezerniert oder werden via Mannose-6-Phosphat-Rezeptor zu lysosomalen Kompartimenten transportiert. In den Kompartimenten werden sie zum reifen Enzym prozessiert und dann entweder intrazellulär eingesetzt oder sezerniert (Dodds et al., 2001). Aktuelle Studien zeigen, dass Kathepsin K intrazellulär in kultivierten humanen Osteoklasten prozessiert und als aktives Enzym sekretiert wird (Ljusberg et al., 2005). Andere Zellen im Knochen, z.B. Osteoblasten oder Osteozyten, exprimierten kein Kathepsin K, weder das Transkript noch das Protein (Littlewood-Evans et al., 1997). Es wurde gezeigt, dass das Enzym am osteoklastenvermittelten Abbau der subosteoklastären kollagenen Knochenmatrix teilnimmt (Bossard et al., 1996; Littlewood-Evans et al., 1997; Votta et al., 1997; Söderström et al., 1999; Dodds et al., 2001; Ljusberg et al.,

2005). Für das aktivierte Kathepsin wurden zwei Proteinkomponenten der Knochenmatrix, Kollagen und Osteonektin, als Substrate identifiziert (Bossard et al., 1996). Kathepsin K besitzt ein einzigartiges Schnittmuster für Kollagen Typ I Moleküle. Es ist grundlegend verschieden von anderen endogenen Kollagenasen. Das Enzym kann Kollagen an verschiedenen Stellen schneiden, dies ist einzigartig für Säugetier-Peptidasen. Kathepsin schneidet direkt verbundene N-terminale und C-terminale Telopeptide (NTX und CTX) von Kollagen I (Garnero et al., 1998; Atley et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass beide Telopeptide, welche man im Urin und im Serum nachweisen kann, als Biomarker für die Knochenresorption genutzt werden können (Clemens et al., 1997; Rosen et al., 2000). Eine erhöhte Kathepsin K-Aktivität wird mit Arthritis, Arteriosklerose, Übergewicht, Schizophrenie und Tumormetastasen in Verbindung gebracht (Novinec und Lenarčič, 2013). Die Wichtigkeit von Kathepsinen bei der Knochenresorption wird zudem deutlich durch den Fakt, dass spezifische Kathepsin-inhibitoren die Knochenresorption sowohl *in vitro* als auch *in vivo* hemmen (Littlewood-Evans et al., 1997). Das pH Optimum für Kathepsin K liegt bei etwa 5,5. Der pH-Wert unter der Bürstensaummembran beträgt etwa 4,0. Der niedrige pH-Wert fördert die Umwandlung von pro-Kathepsin K zum reifen katalytisch aktiven 27 kDa Protein, was entweder durch eine andere Proteinase oder durch einen autokatalytischen Prozess geschieht. Kathepsine im Allgemeinen degradieren Hauptknochenmatrixkomponenten wie Kollagen I und X *in vitro* unter sauren Bedingungen. Der geringe pH-Wert unter der Bürstensaummembran sorgt daher für ideale Bedingungen für die Kathepsine um mineralisierte Matrix-Komponenten abzubauen (Bossard et al., 1996; Drake et al., 1996; Littlewood-Evans et al., 1997; McQueney et al., 1997; Dodds et al., 2001).

Kathepsin K ist eins der bedeutendsten proteolytischen Enzyme, das von den Osteoklasten exprimiert wird. Kathepsin K und L wurden als effiziente Aktivatoren von TRAP identifiziert. Das Enzym spaltet und aktiviert rekombinante TRAP *in vitro* effizient. Es steigert deren katalytische Aktivität, Substrataffinität und Empfindlichkeit gegenüber Reduktionsmitteln. Die Resultate zeigen, dass Kathepsin K und L *in vitro* effizienter als Kathepsin B und S an der Aktivierung von TRAP beteiligt sind. Mäuse mit Überexpression von Kathepsin K zeigten einen gesteigerten Umsatz von methaphysärem trabekulärem Knochen wohingegen Kathepsin-K-Knock-Out Mäuse einen osteopetrotischen Phänotyp entwickelten, aufgrund der gestörten Matrix-Degradierung (Gowen et al., 1999; Saftig et al., 1998; Kiviranta et al., 2005; Ljusberg et al., 2005). Zusammen mit den Beobachtungen der selektiven Expression in hohen Konzentrationen innerhalb von Osteoklasten (Drake et al., 1996), unterstützen diese initialen kinetischen und biochemischen Charakterisierungen von Kathepsin K das Konzept, dass dieses Enzym eng in den Prozess der Knochenresorption eingebunden ist (Bossard et al., 1996).

2.5. Einsatz von mineralisiertem Kollagen für Modellstudien an Osteoklasten

Im Bereich der Knochendefektheilung ist der Einsatz autologer Knochenspenden noch immer Goldstandard (Parikh, 2002; Sen und Miclau, 2007; Zhang et al., 2012). Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit wird jedoch seit langem nach möglichen Ersatzmaterialien gesucht. Osteoinduktivität, Osteokonduktivität, Biokompatibilität, Stabilität und die Fähigkeit biologisch abgebaut zu werden sind Ansprüche, die an ein optimales neues Material gestellt werden (Hutmacher, 2000; Greenwald et al., 2001;

Parikh, 2002; Chim und Schantz, 2005). Das Implantatmaterial soll vollständig in den menschlichen Körper einbezogen werden, was eine Integration in den Remodellingprozess des menschlichen Knochens beinhaltet. Dazu ist es nötig, die Aktivität von Osteoklasten und Osteoblasten zu koordinieren (Bernhardt et al., 2008, 2010). Resorbierbare biomimetische Implantatmaterialien bieten den großen Vorteil, dass sie weder für immer im Körper verbleiben müssen und auch keine zweite Operation nötig ist, um sie wieder zu entfernen.

Die extrazelluläre Matrix des menschlichen Knochens besteht zum Hauptteil aus Kollagen Typ I und Hydroxylapatit. Von Prof. Gelinsky und Mitarbeitern des Zentrums für Translationale Knochen-, Gelenk- und Weichgewebeforschung an der Technischen Universität Dresden, wurde ein biomimetisches Material entwickelt, welches dieser extrazellulären Knochenmatrix stark ähnelt. Es handelt sich um mit Hydroxylapatit mineralisiertes Kollagen Typ I, wobei die Besonderheit im Herstellungsprozess bei der synchronen Bildung der Kollagenfibrillen und des Mineralisierungsprozesses liegt. Durch dieses Verfahren ist es möglich, sowohl zweidimensionale, membranähnliche Tapes (Bernhardt et al., 2008), als auch dreidimensionale Scaffolds herzustellen (Gelinsky et al., 2004). Im feuchten Zustand sind die hergestellten Präparate elastisch (siehe Abb. 2.4 (a) am Beispiel des zweidimensionalen Tapes). Ein Einwachsen der Zellen in die Tiefe der membranähnlichen Tapes wird durch die zu geringe Porengröße verhindert (Bernhardt et al., 2008). Somit eignen sich diese Präparate vor allem für Modellexperimente. Die Tapes weisen eine raue Oberfläche auf (siehe Abb. 2.4 (b)). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Osteoklastogenese aus Monozyten auf diesem Material möglich ist (Domaschke et al., 2006; Bernhardt et al., 2010). Die Zellen können auf dem biomimetischen Material adhärieren und proliferieren. Durch die Ähnlichkeit mit der extrazellulären Matrix menschlichen Knochens kann das Material durch Osteoklasten resorbiert und damit in den natürlichen Prozess des Knochenremodellings integriert werden. Membranähnliches mineralisiertes Kollagentape enthält die Hauptkomponenten des Knochengewebes. In Kombination mit der zweidimensionalen Oberfläche bietet es daher optimale Bedingungen für Untersuchungen des Resorptionsverhaltens von Osteoklasten.

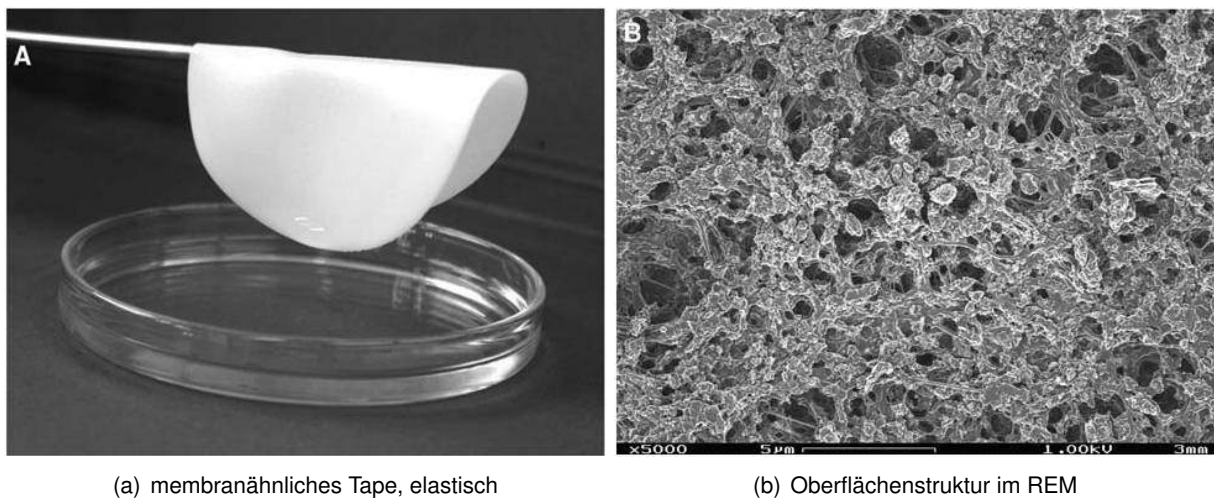


Abbildung 2.4.: (a) Tape aus mineralisiertem Kollagen ist im feuchten Zustand elastisch, (b) Oberflächenstruktur des mineralisierten Kollagentapes mittels REM, Vergrößerung 5000 \times (Abbildungen aus Bernhardt, 2008).

3. Material und Methoden

3.1. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3.1.: Chemikalien und Reagenzien

Name	Hersteller
Alexa Fluor® 488 Phalloidin	Invitrogen
Alpha-Medium (mod. MEM)	Biochrom AG
Biocoll	Sigma-Aldrich
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Collaplex 1.0	GfN
Collagen (rat tail)	Roche Diagnostics GmbH
DAPI Dihydrochlorid (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Invitrogen
Dikaliumhydrogenphosphat-Trihydrat	Merck
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem GmbH
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) kalziumfrei	gibco
N-Dimethylaminopropyl-N'-ethyl-carbodiimid Hydrochlorid (EDC)	Merck
Easycoll Separating Solution	Biochrom
Essigsäure	Merck
Ethanol	VWR Chemicals
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich
Fast red Violet LB Salt	Sigma-Aldrich
Fetale Calf Serum (FCS)	Biochrom AG
Ficoll-Paque™ PLUS	GE Healthcare
Formaldehydlösung neutral gepuffert 4 %	SAV LP GmbH
Glyzin	Sigma-Aldrich
Hämalaunlösung/Hämatoxylin	Roth
Hanks Balanced Salt Solution 10 x (HBSS)	Sigma-Aldrich

Tabelle 3.1.: Chemikalien und Reagenzien

Name	Hersteller
Humanes Serum AB (HBsAG und HIV-AK negativ, sterilfiltriert, Charge B 139)	Sigma-Aldrich
humanes rekombinantes M-CSF (Macrophage colony-stimulating-factor)	antibodies-online Inc.
humanes rekombinantes RANKL	antibodies-online Inc.
Isopropanol	VWR International S.A.S.
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kalziumchlorid	Roth
Kathepsin K Substrat II (Abz-HPG GPQ-EDN2ph)	Calbiochem
Kohlenstoffdioxid	Airliquide
Lymphoprep™	Stemcell Technologies
L-Glutamin	Biochrom AG
MEM Alpha medium powder	Invitrogen
Natriumalginat	Sigma-Aldrich
Natriumtartrat	Sigma-Aldrich
Natriumazetat	Roth
Natriumhydroxyd	Sigma-Aldrich
Natriumhydrogencarbonat	Fluka
Natriumchlorid	VWR Chemicals
Naphthol AS-BI Phosphat	Sigma-Aldrich
Naphthol AS MX phosphat disodium salt	Sigma-Aldrich
4-Nitrophenylazetat	Sigma-Aldrich
Penizillin/Streptomycin	Biochrom AG
Picogreen®	Invitrogen
Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7,4	Gibco
Salzsäure	Roth
Sudan-IV	Sigma-Aldrich
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth
Triton X 100	Merck
Trypanblau	Sigma-Aldrich
QuantiFluor®	Promega

Weiterhin wurde von Osteoblasten (SaOS-2) sezerniertes mineralisiertes Kollagen für Untersuchungen verwendet. Dieses Material wurde, wie von Lutter et al. beschrieben (Lutter et al., 2010), in 48-Well Zellkulturplatten hergestellt und von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt.

Tabelle 3.2.: Übersicht verwendeter Zellkulturmedien

Name des Mediums	Zusammensetzung	
	Basis	variable Zusätze
Standardmedium (M(HS/FCS))	Alphamedium 100 U/ml Penizillin 100 µg/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin	5 % HS 5 % hiFCS
M(aFCS)	wie Standardmedium	10 % FCS
M(hiFCS)	wie Standardmedium	10 % hiFCS
Inkubationsmedium	Alphamedium 100 U/ml Penizillin 100 µg/ml Streptomycin	
Einfriermedium	Alphamedium 100 U/ml Penizillin 100 µg/ml Streptomycin	10 % Dimethylsulfoxid 20 % FCS
Differenzierungsmedium	entsprechend Standardmedium, M(aFCS) oder M(hiFCS)	25 ng/ml M-CSF 50 ng/mL RANKL

3.2. Präparation der Monozyten

Die Isolation von Monozyten für die Experimente erfolgte aus humanem peripherem Spenderblut. Verwendet wurden dafür *buffy coats*, bezogen vom Deutschen Roten Kreuz Kreisverband Dresden e.V., mit schwankendem Füllvolumen zwischen 70 und 95 ml. Es wurde Spenderblut von insgesamt 8 verschiedenen Spendern, im Folgenden mit den Buchstaben A bis H bezeichnet, verwendet. Vor der Präparation wurden LeucosepTM-Röhrchen mit Ficoll-PaqueTM PLUS, Easycoll Separating Solution oder LymphoprepTM gefüllt und bei 1000 × g für 1 Minute zentrifugiert, sodass sich die Flüssigkeit komplett unter der Fritte befand. Der *buffy coat* wurde mit einem Skalpell geöffnet und der Inhalt zunächst mit raumtemperiertem PBS E/B 1:1 verdünnt. Anschließend wurde die verdünnte Leukozytenfraktion gleichmäßig auf die LeucosepTM-Röhrchen aufgeteilt. Jedes LeucosepTM-Röhrchen wurde dabei mit etwa 30 ml gefüllt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei Raumtemperatur, 1000 × g und minimaler Bremsleistung der Zentrifuge für 10 Minuten. Durch diese Dichtegradientenzentrifugation bildeten sich in den LeucosepTM-Röhrchen unterschiedliche Phasen der Blutbestandteile. Das Blutplasma sammelte sich im oberen Teil des Röhrchens als gelblich klarer Überstand und wurde vorsichtig abgesaugt und verworfen. Kurz oberhalb der Fritte entstand ein schmaler weißer Ring, welcher Lymphozyten und Monozyten enthielt. Dieser Ring wurde vollständig mit einer Pipette aspiriert und in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurde als Waschschritt eisgekühltes PBS E/B zur Verdünnung der Zellsuspension eingesetzt. Die Röhrchen wurden danach 15 Minuten bei 250 × g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand des entstandenen Zellpellets wurde abgesaugt und verworfen. Die Erythrozyten, die nach diesen Schritten noch in der Zellsuspension enthalten waren, wurden anschließend lysiert.

Tabelle 3.3.: Zellkulturmedien und Puffer für die Isolierung und Kultivierung von Monozyten

Name	Zusätze im Alphamedium
Kulturmedium entsprechend des Versuchsaufbaus	Standardmedium, M(aFCS) oder M(hiFCS)
Differenzierungsmedium	Kulturmedium mit 25 ng/ml M-CSF und 50 ng/ml RANKL
PBS-E/B-Puffer	PBS mit 0,5 % BSA und 2mM EDTA

Das Zellpellet wurde dafür 60 Sekunden gründlich in 0,5 ml sterilem deionisiertem Wasser resuspendiert. Danach wurde die Zellsuspension sofort mit PBS E/B auf 50 ml aufgefüllt und erneut 15 Minuten bei 250 × g und 4 °C zentrifugiert. Nachdem der Überstand erneut abgesaugt und verworfen wurde, wurden alle Zellen zusammen in 2-3 ml eiskaltem PBS E/B sorgfältig resuspendiert. Nun wurde die Zellzahl mit Hilfe des automatischen Zählgeräts Scepter™ bestimmt. Dafür wurde eine geeignete Verdünnung der Zellsuspension in PBS E/B hergestellt. Die Messung erfolgte mit 40 µm Sensoren. Die Gesamtzellzahl der isolierten Zellen wurde im Größenbereich von 3-12 µm bestimmt. Die Anzahl der Monozytenfraktion wurde in den Grenzen von 7,65-12 µm bestimmt. Mit Hilfe der ermittelten Zahl der Monozytenfraktion wurden dann entsprechend des Versuchsaufbaus die Zellzahlen zur Besiedlung berechnet und anschließend die Besiedlung der Proben beziehungsweise die Kryokonservierung vorgenommen.

3.3. Herstellung des mineralisierten Kollagentapes

Aufreinigung des Kollagens

Handelsübliche Collaplex 1.0-Lösung enthält Konservierungsstoffe, die vor der Verwendung zur Biomaterialsynthese entfernt werden müssen. Dafür wurden zunächst 100 g Collaplex 1.0-Lösung abgewogen und in 400 ml deionisiertem Wasser gelöst. Anschließend wurde 1 mol NaCl zugegeben und die Lösung mit Wasser auf 1 Liter aufgefüllt. Das Gemisch wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt, bis die Lösung homogen war. Es erfolgte eine zweistündige Kühlung bei 4 °C. Anschließend wurde die Lösung erneut aufgerührt und bei 3000 rpm 15 Minuten abzentrifugiert. Die entstandenen Überstände wurden abgenommen. Nach vollständigem Abzentrifugieren der Kollagenlösung, erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt mit 4000 rpm für 15 Minuten. Der entstandene Überstand wurde erneut abgenommen. Anschließend wurden die Kollagenpellets in einen Erlenmeyerkolben mit 400 ml Wasser gegeben und gerührt, bis sie vollständig im Wasser gelöst waren. Danach wurde erneut 1 mol NaCl zugegeben und die Prozedur wie oben beschrieben wiederholt. Nach dem Abzentrifugieren wurden die Kollagenpellets in einen Dialyseschlauch gegeben und in Wasser eine Woche kühl gelagert.

Das Wasser wurde dabei mehrmals gewechselt um den Ionenaustausch für die Aufreinigung des Kollagens zu ermöglichen.

Mineralisierung von Kollagen

Das säurelösliche Kollagen wurde aus dem Dialyseschlauch in einen 2 Liter Erlenmeyerkolben überführt und unter kräftigem Rühren in 100 ml 0,1 M HCl gelöst. Anschließend erfolgte der Reihe nach die Zugabe von 180 ml CaCl_2 -Lösung (0,1 M), 120 ml NaCl (2 M), 168 ml TRIS-Pufferlösung (0,5 M; pH 7,52) sowie 22,6 ml Phosphatpuffer nach Sörensen (0,5 M; pH 7,4). Das Gemisch wurde mit deionisiertem Wasser auf 2 Liter aufgefüllt. Durch Zugabe des Phosphatpuffers kam es zum Ausfallen der Kalziumphosphate, wodurch sich eine milchig farblose Trübung der Lösung ergab. Danach wurde der pH-Wert der Lösung mittels pH-Meter gemessen und, wenn nötig, durch Zugabe von TRIS-Puffer auf 7,4 eingestellt. Anschließend wurde der Fibrillierungsansatz abgedeckt über Nacht in einem Wärmebad bei 35 °C inkubiert um eine gleichmäßige Fibrillierung und Mineralisierung des Kollagens zu erreichen.

Abtrennung des mineralisierten Kollagens durch Zentrifugation

Nach Inkubation im temperierten Wärmebad wurde der Niederschlag kräftig aufgerührt und anschließend das mineralisierte Kollagen in geeigneten Zentrifugenröhrchen abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und bei +5 °C gekühlt aufbewahrt. Die Zentrifugation wurde bis zum gesamten Aufbrauchen der Lösung wiederholt. Anschließend wurden die Kollagenpellets in ein 125 ml Becherglas überführt und abgedeckt bei +5 °C gelagert.

Herstellung von Membranen („Tapes“) aus mineralisiertem Kollagen

Das gesammelte mineralisierte Kollagen wurde im Becherglas mit dem aufbewahrten Überstand auf 100 ml aufgefüllt und mit Hilfe eines Magnetrührers solange gerührt, bis eine homogene Suspension entstand. In eine Halterung wurde eine G-Glasfilterfritte eingespannt und mit deionisiertem Wasser angefeuchtet. Auf diese Fritte wurde ein Teil der Kollagensuspension gegeben und anschließend ein Unterdruck angelegt. Durch das Schwenken der Frittenhalterung wurde das mineralisierte Kollagen gleichmäßig auf der Frittenoberfläche verteilt.

Chemische Quervernetzung des mineralisierten Kollagens

Durch den Unterdruck wurde solange ein Vakuum erzeugt, bis gerade kein Flüssigkeitsfilm mehr auf dem Material zu sehen war. Um Rissbildungen im verdichteten mineralisierten Kollagen zu verhindern wurde die Fritte anschließend sofort belüftet. Danach wurde portionsweise frisch hergestellte Vernetzerlösung auf das verdichtete Material gegeben. Leichtes Schwenken der Fritte diente auch hier wieder der gleichmäßigen Verteilung der Lösung. Durch erneutes Anlegen eines Vakuums wurde die 1 %ige wässrige EDC Lösung durch das Tape gesaugt. Die Einwirkdauer des Vernetzers wurde bei etwa einer Stunde gehalten, wobei er dabei mindestens 30 min durch das Tape floss.

Ablösung und Nachbehandlung des Tapes

Nach einer Stunde wurde die auf dem Tape verbliebene Vernetzerlösung abgenommen und mit wenig deionisiertem Wasser gespült. Die Fritte mit dem darauf befindlichen Tape wurde aus der Apparatur herausgenommen und das Tape mit Hilfe einer scharfen Klinge von der Fritte abgelöst. Anschließend wurde das Tape für 12 – 24 h in eine große, mit Wasser gefüllte, Kristallisierschale gegeben. Danach wurde es für ebenfalls bis zu 24 h in 1 %ige Glyzinlösung überführt und zuletzt noch einmal in Wasser. Mittels anschließender Gefriertrocknung wurde das Tape entwässert.

Das so hergestellte mineralisierte Kollagentape, im folgenden Standardtape genannt, hat einen schwankenden HA-Gehalt zwischen 60 und 65%.

3.4. Herstellung von Kollagengel

Kollagen (Rattenschwanz) wurde in steriler Essigsäure (0,1 %) gelöst. Pro Probe wurden 200 µl Kollagenlösung (2 mg/ml) mit 25 µl 10 x HBSS vermischt. Danach wurde mit 4 µl 1M NaOH (sterilfiltriert) der pH-Wert angehoben. Um die Fibrillierung während des Pipettierens der Proben zu verlangsamen, wurde das Gemisch auf Eis gestellt. Es wurden jeweils 200 µl der neutralisierten Kollagenlösung in die Vertiefung einer 48-Well-Zellkulturplatte pipettiert. Zur vollständigen Fibrillierung wurden die Gelproben anschließend in den Wärmeschrank (37 °C, 5 % CO₂) gestellt.

3.5. Herstellung von Alginatgel

Die Alginatgele wurden freundlicherweise von Kathleen Schütz, ebenfalls Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe, hergestellt. Alginat aus Braunalgen (Sigma-Aldrich) wurde autoklaviert, anschließend in einer Konzentration von 12,5 mg/ml in kalziumfreiem Medium (gibco) aufgenommen und unter Rühren in ein Sol überführt. Je 200 µl des Sols wurden in eine Vertiefung einer 48-Well-Zellkulturplatte pipettiert und mit CaCl₂-Lösung besprüht. Anschließend wurde das Gel mit circa 1 ml CaCl₂-Lösung (100 mM) überschichtet. Nach 30 min Inkubation wurde die CaCl₂-Lösung abgenommen und durch Medium ersetzt und besiedelt.

3.6. Herstellung von *bone chips*

Zylinder aus humanen Hüftköpfen mit einem Durchmesser von 10 mm wurden freundlicherweise von Dr. Mohamed Shosha (Klinik für Orthopädie) zur Verfügung gestellt. Die dafür verwendeten Hüftköpfe wurden nach der Versorgung von Patienten mit einer Hüftendoprothese, mit schriftlicher Einwilligung der Betroffenen, für die Präparation aufbewahrt. Die Zylinder wurden anschließend von Frau Diana Jünger (histologisches Labor) in Scheiben von etwa 1 – 2 mm Dicke gesägt. Anschließend erfolgte die Entfettung der *bone chips* in einem 200 ml Edelstahlautoklaven (Roth) durch superkritisches CO₂. Danach wurden die *bone chips* ebenfalls in diesem Edelstahlautoklaven durch superkritisches CO₂ unter Zugabe von 0,5 ml einer 37 %igen Wasserstoffperoxidlösung und 0,5 ml Azetanhydrid sterilisiert (Bernhardt et al., 2015). Abschließend erfolgte ein weiterer CO₂-Spülschritt im Autoklaven ohne die

Zugabe der Additive, um mögliche chemische Reste auf den Proben zu entfernen. Für einige Experimente wurden die *bone chips* vor der Besiedlung in Alginat- bzw. Kollagengel eingebettet.

3.7. Weitere Zellkulturtechniken

3.7.1. Kultivierung von Monozyten mit osteoklastärer Stimulation auf verschiedenen Materialien

Für die Kultivierung der Monozyten wurden Polystyrol, mineralisierte Kollagentapes, mineralisierte Kollagenmatrix, Kollagengel, *bone chips* aus humanen Hüftköpfen sowie in Kollagengel beziehungsweise in Alginatgel eingebettete *bone chips* mit entsprechend angepasster Zelldichte besiedelt. Am Tag der Besiedlung (d0) erhielten die Zellen M(hiFCS). Das Medium wurde am folgenden Tag (d1) entsprechend des Versuchsaufbaus durch M(HS/FCS), M(aFCS) beziehungsweise M(hiFCS) mit 25 ng/ml M-CSF ersetzt. Am zweiten Tag nach der Besiedlung (d2) erfolgte die Gabe von Differenzierungsmedium, d.h. entsprechendes Kultivierungsmedium mit 25 ng/ml M-CSF und 50 ng/ml RANKL, um die Monozyten zur osteoklastären Differenzierung zu stimulieren. Die Kultivierung der Zellen erfolgte 14 Tage unter Stimulation mit M-CSF und RANKL, dies entspricht 16 Tagen Gesamtkultivierung (d16 als Endpunkt der Kultivierung). Probenentnahmen für biochemische Analysen erfolgten jeweils zu den Zeitpunkten d9 und d16.

3.7.2. Kryokonservierung von Zellen

Für die Kryokonservierung wurden die Zellen in Suspension zunächst für 10 Minuten bei $250 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurde das Zellpellet je nach gewünschter Zellzahl pro Milliliter (ml) mit einer entsprechenden Menge Cryo-SFM beziehungsweise Einfriermedium resuspendiert. Die Suspension wurde dann in Cryo.sTM Einfrier Röhrchen mit einem Volumen von einem ml pipettiert und in einem Einfrierkarussell über Nacht bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Anschließend erfolgte die Lagerung zunächst bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, bis zum Vorliegen eines negativen Mykoplasmentests, danach in flüssigem Stickstoff bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.7.3. Fixieren von Zellen

Zunächst wurden die Überstände abgesaugt und die Proben anschließend zweimal mit raumtemperiertem PBS gespült. Die Zellen wurden durch die Zugabe von 1 ml 4 % Formaldehyd, gepuffert in PBS, pro Well (48 Well Platte) fixiert. Für die TRAP-Färbung wurden die Proben 10 Minuten inkubiert, danach erfolgte sofort die Färbung. Für andere Färbetechniken betrug die Inkubationszeit 1 Stunde, anschließend wurden 750 μl des Formaldehyds abgenommen und durch PBS ersetzt. Die Wellplatten wurden mit Parafilm verschlossen und bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Tabelle 3.4.: Zusammensetzung Azetatpuffer

Chemikalie	Menge in ml
Deionisiertes Wasser	10
Natriumazetatlösung (0,2 M)	7,04
Essigsäure (0,2 M)	2,96

Tabelle 3.5.: Zusammensetzung TRAP-Färbepuffer

Chemikalie	Menge in μ l
Azetatpuffer	1000
Natriumtartratlösung (0,3 M)	200
Naphthol AS-MX Phosphat Lsg.(0,241 mM)	20
Triton™ X-100	2
deionisiertes Wasser	778

3.8. Vorbereitung der Proben für mikroskopische Analysen

3.8.1. Präparation der Tapes für die Rasterelektronenmikroskopie und anschließende mikroskopische Untersuchung

Nach der Lyse der Zellen erfolgten zunächst 2-3 Waschschrte der Tapes mit PBS. Anschließend wurden die Proben mittels einer Alkoholverdünnungsreihe (30 %, 50 %, 70 %, 100 %) und abschließend mit Isopropanol bedeckt und unter dem Abzug getrocknet. Die Proben wurden mit Leit-Tabs auf einem Probenhalter platziert und mit Gold besputtert (Leica EM SCD005). Die REM-Aufnahmen erfolgten an einem ESEM XL30 FEG mittels Detektion der Sekundärelektronen und wurde freundlicherweise von Dr. Anne Bernhardt durchgeführt.

3.8.2. TRAP-Färbung und mikroskopische Untersuchung der Proben

Für die Anfärbung der TRAP in den Osteoklasten wurden die Proben zunächst in Formaldehydlösung für 10 Minuten fixiert. Anschließend wurden die Proben zweimal mit PBS gewaschen. Für die Herstellung der Färbelösung wurden 0,6 mg Fast Red Violet in 2 ml TRAP-Färbepuffer (siehe Tab.3.5) gelöst (0,797 mM). Auf jede Probe in einer 48-Well-Zellkulturplatte wurden 300 μ l/ Well Färbelösung gegeben. Anschließend erfolgte eine zehnminütige Inkubation bei 37 °C. Danach wurde die Färbelösung abgesaugt und zweimal mit PBS gewaschen. Bei positivem Ergebnis erschienen die Proben (blass)-rot. Anschließend erfolgte die Blaufärbung der Zellkerne mit Hämalaunlösung für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Farblösung abgesaugt und die Proben mit Leitungswasser vorsichtig mehrfach gespült. Die mikroskopische Untersuchung erfolgte mit dem Axiovert 40C der Firma Zeiss.

Tabelle 3.6.: Zusammensetzung der Lösungen für die Fluoreszenzfärbung

Lösungen	Zusammensetzung
Lysepuffer	0,1 % TRITON™ X-100 in PBS
Blocklösung	3 % BSA in PBS
Färbelösung	1 µl DAPI / 1 ml Blocklösung 25 µl Alexa Fluor® 488 Phalloidin / 1 ml Blocklösung

3.8.3. Fluoreszenzfärbung und mikroskopische Untersuchung der Proben

Die für die Fluoreszenzfärbung verwendeten Lösungen und ihre Zusammensetzungen sind in Tabelle 3.6 aufgelistet. Die fixierten Proben wurden zunächst mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Permeabilisierung der Zellen mit 0,1 % TRITON™ X-100 in PBS für fünf Minuten (300 µl/Well einer 48-Well-Zellkulturplatte). Danach wurde der Lysepuffer abgenommen und drei bis vier Waschschrte mit PBS durchgeführt. Um die Eigenfluoreszenz der mineralisierten Kollagentapes beziehungsweise der anderen besiedelten Materialien zu unterdrücken, wurden diese in der Blocklösung für 30 Minuten inkubiert (200 µl/Well einer 48 Well-Zellkulturplatte). Anschließend wurde die Blocklösung abgenommen und verworfen. Die Färbung der Proben erfolgte mit DAPI und Alexa Fluor® 488 Phalloidin. Beide Farbstoffe sind in der Färbelösung enthalten, von der je 200 µl/Well auf die Proben geben werden. Es folgte eine Inkubation für 30 Minuten, wobei die Proben dabei mit Hilfe von Aluminiumfolie vor Licht geschützt wurden. DAPI ist ein blau fluoreszierender Farbstoff, der bevorzugt an dsDNA bindet. Alexa Fluor® 488 Phalloidin, ein grün fluoreszierender Farbstoff, dient zur Anfärbung des Zytoskelletts, da es spezifisch an F-Aktin bindet. Nach der Inkubation erfolgten zwei weitere Waschschrte mit PBS. Abschließend konnten die Proben mit PBS überschichtet und abgedunkelt bis zur mikroskopischen Betrachtung bei 4 °C gelagert werden. Die mikroskopische Untersuchung der Proben erfolgte mit einem konfokalen *laser scanning microscope* (LSM) 510 (Zeiss, Jena, Deutschland) bei einer Anregungs-/ Emissionswellenlänge von 405/461 nm (Diodenlaser) für DAPI und 488/519 nm (Argonlaser) für Alexa Fluor® 488 Phalloidin. Außerdem wurden Proben mit dem Keyence BZ-9000 (Bioevo) fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

3.9. Biochemische Analyseverfahren

Um die Proben für die biochemische Messung vorzubereiten, wurde zunächst am gewünschten Tag der Kultivierung das Medium über den Proben abgesaugt und verworfen beziehungsweise für spätere Analysen aufbewahrt. Anschließend wurden die Proben zweimalig mit PBS gewaschen und zur Lagerung bei -80 °C eingefroren. Das Auftauen der Proben erfolgte zunächst 10 Minuten bei Raumtemperatur. Die folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Es erfolgte eine Zugabe von 350 µl Lysepuffer/Well (48 Well-Zellkulturplatte) und die Platten wurden auf Eis 50 Minuten inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde zudem ein 10-minütiger Ultraschall durchgeführt um die Zellmembranen zu permeabilisieren. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Lysate in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und auf Eis gestellt. Anschließend konnten DNA-Gehalt, TRAP-Aktivität sowie CA II-Aktivität

Tabelle 3.7.: Puffer und Lösungen für biochemische Analyseverfahren

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Lysepuffer	1 % TRITON™ X-100 in PBS
20 × TE-Puffer	200 mM TRIS HCl, 20 mM EDTA
DNA-Färbelösung	Picogreen bzw. Quantifluor 1:800 verdünnt mit 1 × TE-Puffer
TRAP-Substratpuffer	100 mM Natriumazetat 50 mM Natriumtartrat 2 % NP-40 1 % EGME pH 6,1
TRAP-Substratlösung	2,5 mM Naphthol-ASBI-Phosphat in TRAP-Substratpuffer
TRAP-Stopplösung	0,1 M NaOH
Nitrophenylazetatlösung	100 mM p-Nitrophenylazetat in Azeton
CAlI-Substratpuffer	12,5 mM TRIS + 75 mM NaCl
CAlI-Substratlösung	2 mM p-Nitrophenylazetatlösung in CAlI-Substratpuffer
CSK-Substratpuffer	0,1 M Natriumazetat 4 mM EDTA pH 5,5
CSK-Substrat (Abz-HPG GPQ-EDN2ph, Merck-Millipore)	1,5 mM Substrat in DMSO
CSK-Substratlösung	pro ml je 40 µl DTT (100 mM) 10 µl CSK-Substrat 950 µl CSK Substratpuffer

mittels biochemischer Messung bestimmt werden.

3.9.1. Messung des DNA-Gehalts

Zur Vorbereitung der DNA-Messung wurde zunächst ein 1 × TE Puffer durch die Verdünnung eines 20 × TE Puffers mit deionisiertem Wasser hergestellt. Der Picogreen beziehungsweise Quantifluor Fluoreszenzfarbstoff wurde in einem Verhältnis von 1:800 zu dem 1 × TE Puffer gegeben. Je 10 µl der Lysate (Doppelbestimmung) wurden pro Well in eine schwarze 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wurden je 190 µl/Well der DNA-Färbelösung zugegeben und für 5 Minuten abgedunkelt auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Die Fluoreszenz wurde bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm gemessen (Infinite® M200 PRO, Tecan).

3.9.2. Messung der TRAP-Aktivität

Jeweils 10 µl/Well der Lysate (Doppelbestimmung) wurden in eine schwarze 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Naphthol-ASBI-Phosphat wurde als Substratlösung für die Bestimmung der tartratresistenten sauren Phosphatase (TRAP) verwendet. Je 50 µl der Substratlösung wurden pro Well zugegeben und für 30 Minuten abgedunkelt bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte durch Zugabe von 125 µl TRAP-Stopplösung pro Well das Abstoppen der enzymatischen Reaktion. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 405 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm (Infinite® M200 PRO, Tecan). Die gemessene Fluoreszenz konnte mit Hilfe einer TRAP-Kalibriergerade (Bone TRAP® Kalibrierlösungen) in die entsprechenden TRAP-Aktivitäten umgerechnet werden.

3.9.3. Messung der CAII-Aktivität

Je 50 µl/Well der Lysate (Doppelbestimmung) wurden in eine transparente 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert. Das Substrat für die Enzymreaktion der Carboanhydrase II wurde 4-Nitrophenylazetat eingesetzt, welches im Reaktionsverlauf hydrolytisch gespalten wird. Als Reaktionsprodukt entsteht para-Nitrophenol (pNp), welches die Lösung leicht gelb färbt. Diese Farbreaktion kann photometrisch quantifiziert werden. Es wurden je 50 µl/Well der CA II Substratlösung zu den Proben hinzugefügt. Nach einer initialen Temperierungsphase von etwa 5 Minuten wurde die Zunahme der Absorption über die Zeit bei einer Wellenlänge von 400 nm gemessen (Infinite® M200 PRO, Tecan). Die Dauer der Messung wurde entsprechend der Probenanzahl variiert. Die Umrechnung der Absorptionsänderung in die entsprechende Enzymaktivität (hier als Substratumsatz/Zeit) konnte mit Hilfe einer pNp-Kalibriergerade erfolgen.

3.9.4. Messung der Kathepsin K-Aktivität

Für die Messung der Kathepsin K-Aktivität wurden zum Zeitpunkt eines jeden Mediumwechsels die Überstände der Proben gesammelt und anschließend bei -20 °C bis zur Messung aufbewahrt. Die Messung erfolgte nach Auftauen und Vortexen der Proben. Die Substratlösung wurde frisch angesetzt (siehe Tab.3.7).

Von jeder Probe wurden 50 µl/Well (Doppelbestimmung) in eine schwarze 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert und anschließend 50 µl Substratlösung pro Well zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 3 Minuten abgedunkelt bei Raumtemperatur erfolgte die Messung der Enzymaktivität bei einer Anregungswellenlänge von 320 nm und einer Emissionswellenlänge von 420 nm (Infinite® M200 PRO, Tecan) (Lecaille et al., 2003).

3.10. Statistik

Zur statistischen Auswertung der erhobenen Daten wurde die Varianzanalyse (ANOVA) für ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ (Tukey Test) mit dem Programm OriginPro 2015 durchgeführt. Je nach Versuchsaufbau wurde dabei eine *Einfache ANOVA* oder eine *Zweifache ANOVA mit wiederholten Messungen* angewendet. Letztere Methode kam zum Einsatz, wenn Experimente mit gleichem Versuchsaufbau mit verschiedenen Spendern durchgeführt wurden. Mit Hilfe der *Zweifachen ANOVA*

mit *wiederholten Messungen* wurden die zu einer Probenart (z.B. pH-Wert des Mediums, Material) gehörigen Daten n_x der Einzelspender (wobei x der jeweiligen Spenderbezeichnung entspricht) zur Gesamtprobenzahl n zusammengefasst. Die so erzeugten Probengruppen wurden dann der Varianzanalyse unterzogen.

Beispiel: In 4.10 wurde die Osteoklastogenese auf Polystyrol, Tape und mineralisierter Kollagenmatrix zum Zeitpunkt d9 verglichen. Hierbei wurden pro Material Daten von Spender A, B und C mit je $n_x=5$ erhoben. Jede Probengruppe (Polystyrol, Tape beziehungsweise mineralisierte Kollagenmatrix) besteht somit aus n=15 Proben. Mittels *Zweifacher ANOVA mit wiederholten Messungen* wurden diese Probengruppen anschließend hinsichtlich signifikanter Unterschiede untersucht.

Die errechneten Mittelwerte und dazugehörigen Standardabweichungen der Daten wurden in der vorliegenden Arbeit in Balkendiagrammen dargestellt, welche in Microsoft Excel 2010 erstellt wurden.

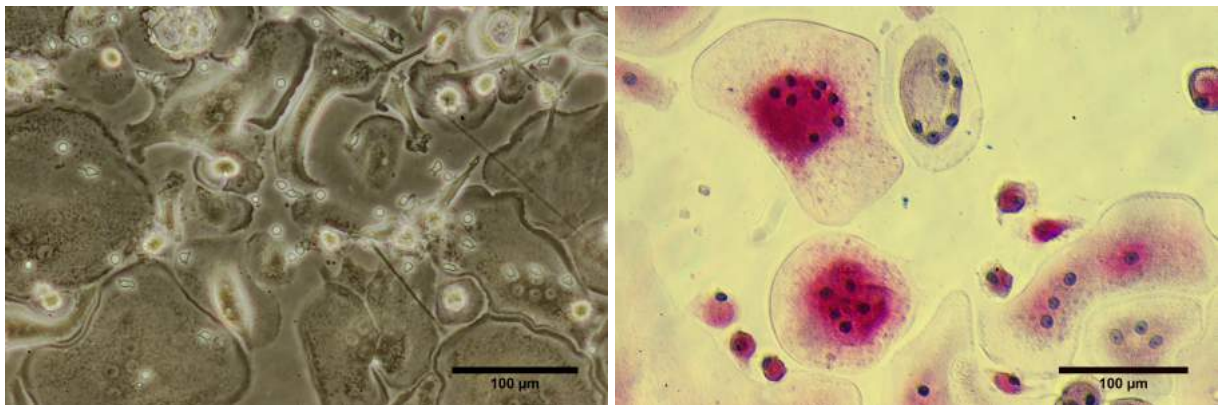
4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Charakterisierung der präparierten Monozyten

Für *in vitro* Untersuchungen an Osteoklasten werden verschiedene Zellspezies eingesetzt, z.B. primäre murine Osteoklasten (Hoebertz und Arnett, 2003; Kirstein et al., 2006) oder die murine Zelllinie RAW 264.7. Um jedoch Aussagen über das Verhalten menschlicher Osteoklasten treffen zu können, ist es erstrebenswert, humane Zellen für derartige Experimente zu verwenden. Humane mononukleare Blutzellen (PBMC) stellen Vorläufer von Osteoklasten dar und können beispielsweise aus peripherem Blut isoliert und für derartige Experimente eingesetzt werden (Schilling et al., 2004; Cody et al., 2011; Costa-Rodrigues et al., 2012). Ebenfalls beschrieben wurde die Isolation von PBMC und anschließende Generierung von Osteoklasten aus peritonealen Makrophagen (Quinn et al., 1998), Nabelschnurblut (Orcel et al., 1990), *buffy coats* (Schilling et al., 2004; Nicholson et al., 2000), sowie Knochenmark (Quinn et al., 1998; Schilling et al., 2004; Cody et al., 2011).

PBMC setzen sich aus verschiedenen Zelltypen zusammen. Das Zellgemisch enthält etwa 10-15 % Monozyten, 66 % T-Lymphozyten, 9 % B-Zellen und eine geringe Anzahl anderer Blutzellen (Nicholson et al., 2000; Shalhoub et al., 2000). PBMC können einfach und in großer Anzahl isoliert werden. Diese eigentliche Ko-Kultur von Osteoklastenvorläufern und anderen akzessorischen hämatopoetischen Zellen stellt einen einfachen, effizienten und schnellen Weg dar, Kulturen zu schaffen, die reich an Osteoklasten sind. Zudem zeigen PBMC einen gewissen Grad an spontaner Osteoklastogenese. Die wahrscheinlich beste Monozyten-Vorläufer-Subpopulation stellt die $CD14^{+}/CD16^{-}$ Fraktion dar (Nicholson et al., 2000; Costa-Rodrigues et al., 2012; Komano et al., 2006). $CD14^{+}$ Zellen werden von verschiedenen Arbeitsgruppen zur Osteoklastogenese eingesetzt (Nicholson et al., 2000; Domaschke et al., 2006; Davison et al., 2014; Cheng et al., 2015). Um reine $CD14^{+}$ Zellen zu isolieren ist allerdings ein umfangreiches Verfahren notwendig. Es beinhaltet eine zeitaufwändige Zellmanipulation, das *Labeln* der $CD14^{+}$ Fraktion, sowie deren magnetische Auftrennung. Vorteil ist, dass sich diese Zellpopulation hoch sensitiv gegenüber osteoklasteninduzierenden Faktoren verhält und sich daher sehr gut für Zellkulturexperimente zur Untersuchung von Osteoklasten eignet (Costa-Rodrigues et al., 2012). Schilling et al. isolierten Monozyten aus Knochenmark, *buffy coats* und peripherem Blut und besiedelten damit Dentin, Kalziumphosphat-Zement sowie Polymethylmethacrylat. Aus allen drei verwendeten Quellen konnten ausreichend monozytärer Vorläuferzellen für die Experimente isoliert werden. *Buffy coats*, ein Abfallprodukt bei der Herstellung von Blutkonserven, enthalten ein Leukozytenkonzentrat aus 500 ml Blut. Daher sind in 50 ml *buffy coat* etwa zehnmal mehr Monozyten enthalten als in 50 ml peripherem Blut. Schilling et al. entschieden sich für weitere Experimente *buffy coats* zu verwenden, da diese eine ausreichende Menge an Monozyten lieferten (Schilling et al., 2004). Das Verfahren zur Isolation der Monozytenfraktion aus *buffy coats* ist zudem relativ einfach und kostengünstig. Eine Immunselektion von Monozyten hinsichtlich der Isolierung von $CD14^{+}/CD16^{-}$ Zellen ist sowohl für die routinemäßige Anwendung als auch für große Blutmengen sehr teuer (De Almeida

et al., 2000). Daher wurden auch in der vorliegenden Arbeit *buffy coats* als Quelle für osteoklastäre Vorläuferzellen genutzt und die Monozytenfraktion mittels Dichtegradientenzentrifugation aus ihnen isoliert. Durch die Präparation aus *buffy coats* (siehe unter Abschnitt 3 Material und Methoden) ist es gelungen Monozyten mit einer mittleren Reinheit von $32,25\% \pm 7,32\%$ zu isolieren. Die Zellen wurden mit M(hiFCS), welches 10 % hitzeinaktiviertes FCS (hiFCS) enthielt, auf verschiedenen Materialien ausgesiedelt. Monozyten haben die Eigenschaft, stark an Plastikoberflächen zu adhären. Koller et. al beschrieben in ihrer Arbeit, dass serumhaltiges Medium die Adhärenz von Lymphozyten auf der Zellkulturoberfläche verminderte und die Reinheit der Monozytenkultur somit wesentlich erhöht werden konnte (Koller et al., 1973). Zudem wurde beschrieben, dass Monozyten besser an der Oberfläche des Zellkulturträgers adhärten und schneller zu Makrophagen differenzieren, wenn das Medium Serum enthielt. Die Zugabe von Serum unterstützt außerdem das Überleben der Zellen da es verschiedene Nährstoffe für die Zellen liefert (Bennett und Breit, 1994). In der vorliegenden Arbeit wurde nach 24 Stunden ein erneuter Mediumwechsel durchgeführt, wodurch ein Großteil der nicht adhären Zellen, also vor allem die Monozytenkultur verunreinigende Lymphozyten, entfernt werden konnten. Dadurch wurde eine hohe Reinheit der Monozyten auf den Proben erreicht. Diese wurden anschließend durch Zugabe von M-CSF und RANKL zur osteoklastären Differenzierung angeregt. Mittels Lichtmikroskop konnten nach 5-6 Tagen Kultivierung mehrkernige Osteoklasten auf Polystyrol nachgewiesen werden (siehe dazu Abb. 4.1).



(a) Mehrkernige Osteoklasten auf Polystyrol

(b) Osteoklasten auf Polystyrol nach TRAP-Färbung

Abbildung 4.1.: Mehrkernige Osteoklasten (a) auf Polystyrol nach 13 Tagen Kultivierung unter Stimulation mit M-CSF und RANKL und (b) angefärbt mit TRAP-Färbung nach 16 Tagen Kultivierung unter Stimulation mit M-CSF und RANKL. Maßbalken entsprechen 100 µm.

Im Laufe der Jahre wurden einige Enzyme als Marker für Osteoklasten identifiziert. Insbesondere der tartratresistente sauren Phosphatase mit ihrem Isoenzym TRAP 5b wird große Bedeutung als Osteoklastenmarker zugesprochen (Scheven et al., 1997; Alatalo et al., 2000; Halleen et al., 2000). Zudem kann die Carboanhydrase II (CAII) als osteoklastenspezifisches Enzym bestimmt werden (Kenny, 1985; Hall und Kenny, 1987; Lehenkari et al., 1998; Detsch et al., 2010a). In den hier beschriebenen Experimenten wurden die Aktivitäten der beiden genannten Enzyme im Zelllysat gemessen. Zudem wurden die TRAP-Aktivität und die Aktivität von Kathepsin K im Überstand der Proben untersucht. Für die Kultivierung der Zellen wurde dem Medium ab d1 M-CSF zugesetzt, jedoch noch kein RANKL. Ab dem zweiten Tag (d2) wurden die Monozyten zusätzlich mit RANKL stimuliert, um die osteoklastäre Differenzierung anzuregen. Bernhardt et al. konnten bereits nachweisen, dass TRAP- und CAII-Aktivität der Zellen unter osteoklastärer Stimulation von d2 zu d9 signifikant ansteigen (Bernhardt et al., 2014). Es gibt jedoch keine Korrelation zwischen TRAP- und CAII-Aktivität, weder auf Tape noch auf Polystyrol.

Die Genexpression von TRAP (Minkin, 1982; Ek-Rylander et al., 1991; Ljusberg et al., 2005; Detsch et al., 2010b) sowie CAII (Lehenkari et al., 1998; Detsch et al., 2010b) wurden von verschiedenen Gruppen untersucht. Die histochemische Anfärbung der TRAP ist eine häufig genutzte Methode um zwischen TRAP-positiven osteoklastären Zellen und undifferenzierten Monozyten zu unterscheiden (Detsch et al., 2010a; Wu et al., 2014). Im vergangenen Jahrhundert wurden bereits Immuno- und Enzymassays publiziert (Minkin, 1982; Lau et al., 1987), aber keiner dieser Assays konnte zwischen der von Osteoklasten stammenden Isoform TRAP 5b und der nicht von Osteoklasten stammenden Isoform TRAP 5a unterscheiden. Halleen et al. etablierten ein Immunoassay, welches den mononuklearen Antikörper (MAb) O1A benutzt, um die TRAP im Serum zu binden (Halleen et al., 2000). Es wurde gezeigt, dass O1A nicht die von Erythrozyten und Thrombozyten stammende TRAP bindet und auch nur das 32 kD Typ 5 TRAP Band von menschlichen Knochen und Humanserum im Western-Blot erkennt. Daher ist dieser entwickelte Assay spezifisch für Typ 5 TRAP. Durch die Messung bei einem pH-Wert von 6,1 wird die osteoklastenspezifische Isoform TRAP 5b erfasst. Janckila et al. zeigten in einer Studie, dass sich Naphthol-ASBI-Phosphat als fluoreszierendes Substrat im biochemischen Assay für den spezifischen Nachweis von TRAP 5b im Serum eignet (Janckila et al., 2001).

Halleen et al. beschrieben, dass sich die TRAP-Aktivität nach sechsmonatiger Lagerung der Serumproben bei -80 °C nicht von der bei frischen Proben gemessenen Aktivität unterschied. Wurden die Proben hingegen bei -20 °C gelagert, konnten nur noch 63 % der ursprünglichen Aktivität nachgewiesen werden. Wiederholte Auftau- und Einfrierzyklen hatten keinen Effekt auf die Menge der detektierten TRAP 5b Aktivität (Halleen et al., 2000). Die Zellkulturproben der Experimente wurden nach Kultivierung bis zur Messung bei -80 °C gelagert.

4.2. Untersuchung zur Besiedlungszellzahl

Bei der *in vitro*-Kultivierung von Osteoklasten könnte die Besiedlungsdichte von Monozyten einen Einfluss auf die Osteoklastogenese haben. Demnach wäre die anfängliche Anzahl mononuklearer Zellen, die für die Besiedlung der Proben eingesetzt wird, entscheidend für die weitere Differenzierung und das Überleben der entstehenden Osteoklasten. Ob ein solcher Einfluss der Besiedlungszelldichte tatsächlich besteht und wenn ja, welche Zelldichte optimal für Experimente zur Untersuchung des Resorptionsverhaltens von Osteoklasten ist, wurde bereits von verschiedenen Gruppen untersucht (siehe dazu Tabelle 4.1). Zu Beginn der hier beschriebenen Experimente wurde ebenfalls eine solche Untersuchung durchgeführt. Für die Festlegung der getesteten Zelldichten wurden orientierend bereits in der Literatur zu findende Angaben genutzt.

Schilling et al. untersuchten in einem umfangreichen Experiment den Einfluss der Besiedlungsdichte von Monozyten auf die Differenzierung zu Osteoklasten und deren Überleben. Hierbei verwendete die Gruppe aus *buffy coats* isolierte mononukleare Vorläuferzellen in Konzentrationen von $1 \times 10^4 \times \text{ml}^{-1}$ bis $1 \times 10^8 \times \text{ml}^{-1}$. Es konnte gezeigt werden, dass die Osteoklastogenese abhängig von der anfängliche Besiedlungszelldichte bis zu einer Dichte von 1×10^7 Zellen $\times \text{ml}^{-1}$ anstieg. Wurde die Zelldichte um das zehnfache erhöht, so ergaben sich 1,5- bis 2-fache Mengen an Osteoklasten. Ab einer Zelldichte von 1×10^8 Zellen $\times \text{ml}^{-1}$ konnten jedoch keine Osteoklasten mehr nachgewiesen werden (Schilling et al., 2004). Akchurin et al. untersuchten ebenfalls den Einfluss der Besiedlungsdichte von Monozyten auf die Entwicklung von Osteoklastenkulturen. In jedem Experiment wurde dabei die Maximalrate der Osteoklastenbildung, die maximale Zelltodrate und die maximale Anzahl gebildeter Osteoklasten über den Zeitraum des jeweiligen Experiments errechnet. Hierbei wurden Zelldichten von $2,5 \times 10^3 \times \text{cm}^{-2}$, $5 \times 10^3 \times \text{cm}^{-2}$ und $10 \times 10^3 \times \text{cm}^{-2}$ eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Parameter von den verschiedenen Besiedlungsdichten nicht beeinflusst wurden (Akchurin et al., 2008). Ein Versuch der Gruppe Costa-Rodrigues et al., bei dem Zelldichten von $3 \times 10^6 \times \text{cm}^{-2}$ und $1,5 \times 10^6 \times \text{cm}^{-2}$ für PBMC sowie für CD14^+ und CD14^- Zellen eingesetzt wurden, hat gezeigt, dass die anfängliche Zelldichte keinen Einfluss auf die gemessenen TRAP-Aktivitäten sowie auf die Anzahl TRAP-positiver multinuklearer Zellen hatte. Im späteren Versuch verwendete die Gruppe dann eine Besiedlungszellzahl von $1,5 \times 10^6$ Zellen $\times \text{cm}^{-2}$ (Costa-Rodrigues et al., 2011). Shafieyan et al. hingegen berichten, dass bereits geringe Abweichungen von einer Besiedlungszelldichte von 5×10^3 Zellen $\times \text{cm}^{-2}$ zu einer signifikanten Reduzierung der Qualität der sich nachfolgend entwickelnden Osteoklasten führte (Shafieyan et al., 2012). In den Experimenten der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung des Einflusses der Besiedlungszelldichte auf die Differenzierung von PBMC zu Osteoklasten wurden Zellzahlen von 3×10^5 und 6×10^5 für Zellkulturpolystyrol und 6×10^5 sowie $1,2 \times 10^6$ für mineralisierte Kollagentapes ausgewählt (Angaben pro Well einer 48-Well Zellkulturplatte). Es wurden vergleichsweise geringe Besiedlungszelldichten verwendet, da im Gegensatz zu anderen Arbeiten nicht die Gesamtanzahl der PBMC sondern nur die Zellen, welche in der Zellzählung einen Durchmesser in den Grenzen von 7,56 und 12 μm aufwiesen, in die Berechnung einbezogen wurden. Auf mineralisiertem Kollagentape wurde eine höhere Zellzahl als auf Polystyrol eingesetzt, da die Oberfläche rauer und somit größer ist und dadurch die Fusion der Monozyten zu mehrkernigen Osteoklasten erschwert sein könnte. Die Experimente wurden in 48-Well-Zellkulturplatten durchgeführt. Die erhobenen Daten dieser Versuche sind in Abbildung 4.2 für Polystyrol, sowie in Abbildung 4.3 für mineralisiertes Kollagentape dargestellt.

Tabelle 4.1.: Besiedlungszelldichten verschiedener Arbeitsgruppen.

Um einen Vergleich zu ermöglichen, wurden die in den Arbeiten der hier zitierten Gruppen angegebenen Besiedlungszellzahlen jeweils auf die Besiedlung einer Fläche, die einem Well einer 48-Well-Zellkulturplatte ($0,95\text{ cm}^2$) beziehungsweise 1 cm^2 entspricht, umgerechnet.

Quelle	Zellen	Anzahl/ Well	Anzahl pro cm^2
Takahashi et al., 1989	mononukleare Knochenmarkzellen	$2,5 \times 10^5$	$2,63 \times 10^5$
Hattersley et al., 1989	mononukleare Knochenmarkzelle	$1,12 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$
Heymann et al., 1997	mononukleare Knochenmarkzellen	5×10^5	$5,3 \times 10^5$
Schilling et al., 2004	Monozyten	5×10^3	$5,3 \times 10^3$
		5×10^4	$5,3 \times 10^4$
		5×10^5	$5,3 \times 10^5$
		5×10^6	$5,3 \times 10^6$
		5×10^7	$5,3 \times 10^7$
Li et al., 2005	mononukleare Knochenmarkzellen	$2,8 \times 10^5$	$2,9 \times 10^5$
Akchurin et al., 2008	Monozyten	$2,4 \times 10^3$	$2,5 \times 10^3$
		$4,75 \times 10^3$	5×10^3
		$9,5 \times 10^3$	10×10^3
Costa-Rodrigues et al., 2011	PBMC, CD14^+ und CD14^- Monozyten	$2,85 \times 10^6$	3×10^6
		$1,43 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$
Shafieyan et al., 2012	Monozyten	$4,75 \times 10^3$	5×10^3
Wu et al., 2014	PBMC	1×10^6	$1,05 \times 10^6$

4.2. Untersuchung zur Besiedlungszellzahl

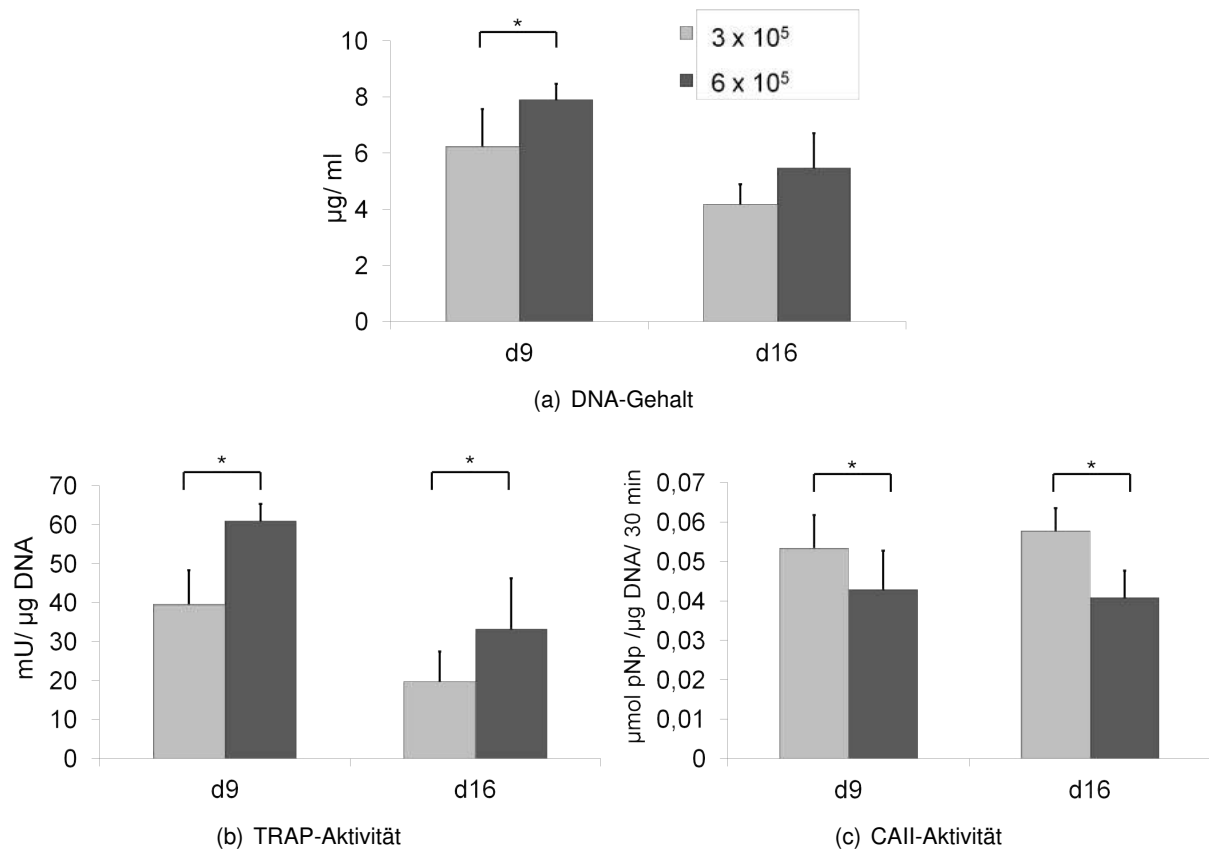


Abbildung 4.2.: Osteoklastogenese von PBMC (Spender H mit $n=5$) auf Polystyrol über 16 Tage mit einer Besiedlungszellzahl von 3×10^5 (hellgrau) und 6×10^5 (dunkelgrau), Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen, * $p < 0,05$.

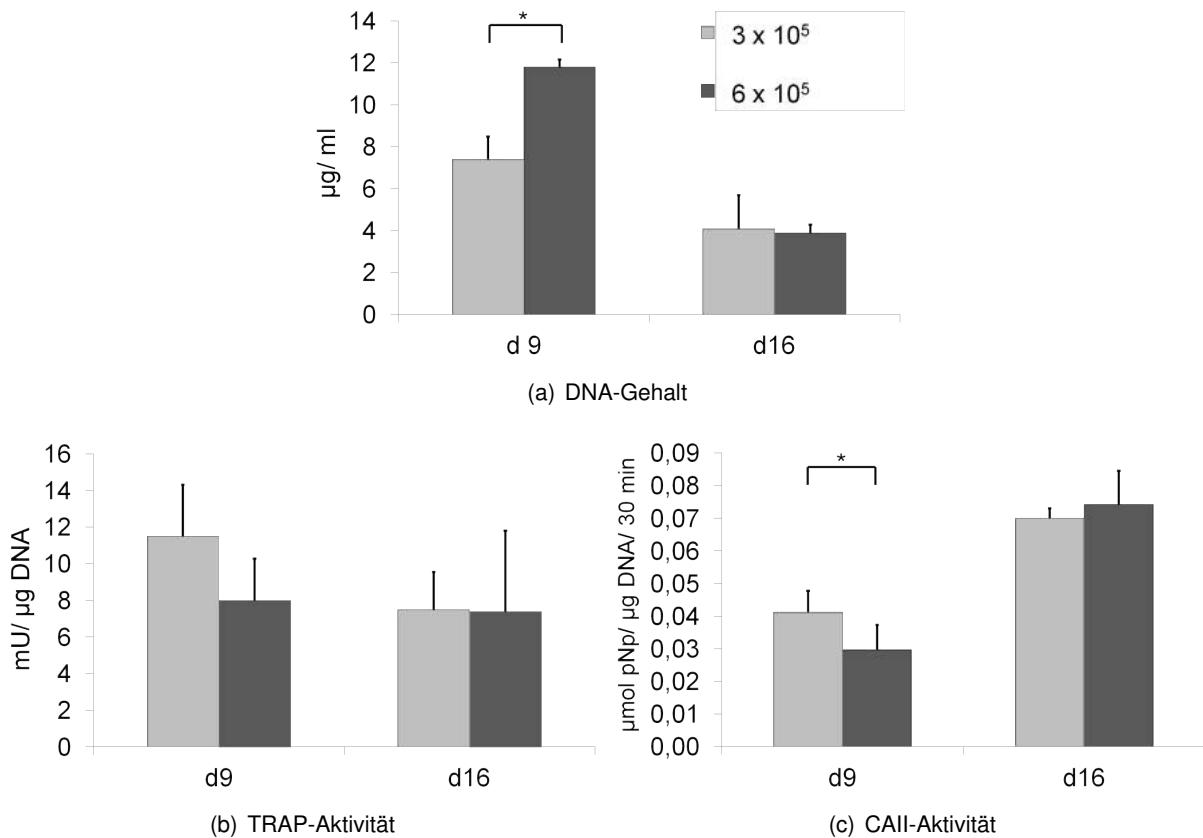


Abbildung 4.3.: DNA-Gehalt, TRAP- und CAII-Aktivität von Osteoklasten (Spender H mit $n=5$) auf mineralisiertem Kollagentape mit einer Besiedlungszellzahl von 6×10^5 (hellgrau) und $1,2 \times 10^6$ (dunkelgrau) nach 16 Tagen Kultivierung unter Stimulation mit M-CSF und RANKL. Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen, * $p < 0,05$.

Wie in Abb. 4.2 erkennbar ist, wurden auf Polystyrol bei einer Besiedlungszellzahl von 6×10^5 Monozyten signifikant höhere TRAP-Aktivitäten erreicht als bei einer Zellzahl von 3×10^5 . Im Gegensatz dazu wurden bei der höheren Zelldichte auf diesen Proben signifikant geringere CAII-Aktivitäten gemessen als bei der geringeren Zelldichte. Da die Isolation von Monozyten aufwändig ist und pro Experiment möglichst viele Proben besiedelt werden sollten, wurde entschieden, dass eine Zellzahl von 3×10^5 pro Polystyrolprobe am effizientesten ist. Auf Proben des mineralisierten Kollagentapes zeigte eine höhere Besiedlungszellzahl von $1,2 \times 10^6$ keinen signifikanten Einfluss auf die Enzymaktivitäten von TRAP und CAII (siehe Abb. 4.3). Daher wurden mineralisierte Kollagentapes in folgenden Experimenten mit einer Zellzahl von 6×10^5 pro Probe besiedelt.

4.3. Untersuchung zur Vorbehandlung der Tapes mit hiFCS-haltigem Medium

Adhärenz ist ein bekanntes Aktivierungssignal für Monozyten. Sie unterstützt die Umwandlung der zirkulierenden Zellen zu Gewebemakrophagen. Shaw et al. zeigten, dass die Adhärenz selbst als Trigger für verschiedene spezifische Sequenzen von Prozessen im Differenzierungsvorgang fungiert (Shaw et al., 1990). Für Zellkulturexperimente zur Untersuchung von Osteoklasten wäre es daher von Vorteil, die Adhärenz der mononuklearen Vorläuferzellen auf der Kultivierungsoberfläche zu fördern. Monozyten zeigen eine starke Adhärenz auf Plastikoberflächen. Auch andere PBMC können auf Plastik adhären, jedoch in der Regel schwächer als Monozyten. Daher ist es möglich, diese anderen Zellen durch einen einfachen Waschschrift zu entfernen. Der Oberflächentyp und das eingesetzte Medium beeinflussen ebenfalls die Ausbeute und letztlich die Reinheit der Monozytenfraktion (Koller et al., 1973; Kumaratilake und Ferrante, 1988; Bennett und Breit, 1994). Der initiale Adhäsionsprozess von osteoklastären Vorläuferzellen wird durch verschiedene Membranrezeptoren vermittelt. Besonders bedeutend ist der Vitronektinrezeptor, der Bindungsdomänen auf nicht-kollagenen Proteinen der Knochenmatrix detektiert (Osteopontin, *bone sialoprotein*, Vitronektin und Fibronektin) (Redey et al., 1999). Ob Osteoklasten auf Oberflächen adhären, hängt von der Anwesenheit spezifischer, der Oberfläche eines Biomaterials anhaftender Proteine ab, mit denen die Zellrezeptoren in Wechselwirkung treten (Grano et al., 1994; Ruoslahti und Öbrink, 1996; Faccio et al., 1998). Diese Tatsache führt zu der Idee, Zelloberflächen durch Proteine zu modifizieren, um so die Adhärenz von osteoklastären Vorläuferzellen zu fördern. Eine Möglichkeit dafür ist die Inkubation der verwendeten Proben mit fetalem Kälberserum (FCS), welches unter anderem Vitronektin enthält (Redey et al., 1999). Durch die Inkubation könnten Serumproteine von den Proben adsorbiert werden und somit die Adhärenz der später ausgesiedelten Zellen beeinflussen.

Die Gruppe Botelho et al. untersuchte die Adhärenz von Serumproteinen auf verschiedenen Oberflächen, darunter Hydroxylapatit (HA) und Gewebekulturplastik. Die Proben wurden mit Humanserum in Konzentrationen von 1 % und 10 % 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die jeweilige Proteinkonzentration im Probenüberstand bestimmt. Dadurch konnte auf die durch die Oberfläche adsorbierte Serumproteinmenge geschlossen werden. Etwa 80-90 % der vorherigen Proteinmenge waren nach der Inkubation im Medium noch nachweisbar. Es gab keine signifikanten Unterschiede bei der Adsorption zwischen den beiden getesteten Serumkonzentrationen. Bei der berechneten Totalen Bindungskapazität der Proben (μg adhärierter Proteine pro Oberfläche in mm^2) zeigte HA höhere Werte als Plastik, jedoch ohne statistische Signifikanz (Botelho et al., 2005).

Kumagai et al. untersuchten, ob die Beschichtung von Zellkulturträgern mit hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (hiFCS) einen Einfluss auf die Adhärenz peripherer mononuklearer Zellen hat. Ziel des Versuchs war es, Monozyten und Makrophagen durch Adhärenz am Zellkulturträger zu isolieren (Kumagai et al., 1979). Plastik-Zellträger wurden mit hiFCS beschichtet und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Die beschichteten Oberflächen wurden nach einigen Waschschriften mit PBMC besiedelt. Das dafür verwendete Medium enthielt 10 % hiFCS. Daraufhin adhärten auf den Trägern selektiv Monozyten und Makrophagen. Der Überstand mit den enthaltenen nicht adhärenen Zellen wurde entfernt. Die adhärten Zellen konnten anschließend mittels FCS-EDTA-Lösung vom Zellträger abgelöst werden. Auf Zellträgern, die mit hiFCS inkubiert wurden, adhärten nachweislich mehr Zellen und es konnten Makrophagen mit einer Reinheit von 96-99 % festgestellt werden. Auf den Zellträgern, die nicht mit

hiFCS inkubiert wurden, adhärten nur 35 % aller Makrophagen mit einer durchschnittlichen Reinheit von 68 %. Zudem blieben, anders als bei den mit hiFCS inkubierten Zellträgern, viele Zellen nach anschließender Inkubation mit FCS-EDTA-haltiger Lösung adhärent. Auf serumbeschichteten Zellträgern adhärten die mononuklearen Zellen also besser und ließen sich auch besser wieder durch FCS-EDTA-Lösung ablösen. Die Zellen behielten auch nach mehrmaligem Adhären und wieder Ablösen ihre Makrophagen-Eigenschaften wie die Fähigkeit zur Phagozytose (Kumagai et al., 1979). Serumproteine, können sich auch negativ auf die ausgesiedelten Monozyten auswirken. Johnson et al. zeigten, dass die Anwesenheit von zuvor erhitztem autologem Serum (56 °C) im Kultivierungsmedium nach 6-12 h zu einer Zusammenlagerung von Monozyten führte (Johnson Jr et al., 1977). Um zu testen, ob FCS die Adhäsion von Monozyten auf mineralisiertem Kollagentape beeinflusst, wurden in der vorliegenden Arbeit PBMC auf Kollagentapes gesiedelt, welche zuvor 24 h in Medium mit und ohne Zusatz von hiFCS inkubiert wurden. Die Zellen wurden anschließend unter osteoklastärer Stimulation bis zu 16 Tage weiterkultiviert. In Abb. 4.4 sind die Ergebnisse des durchgeführten Experiments dargestellt. Die Messdaten des DNA-Gehalts (Abb. 4.4 (a)) zeigten an Tag 9 einen signifikanten Unterschied zwischen den mit M(hiFCS) vorbehandelten und den mit unverändertem Inkubationsmedium behandelten Proben. Dieses Ergebnis könnte auf eine bessere Adhärenz der Monozyten auf Tapes, die ohne hiFCS vorbehandelt wurden, hindeuten. Eine andere Erklärung wäre ein möglicherweise negativer Einfluss der in hiFCS inkubierten Tapes auf das Proliferationsverhalten der Monozyten, sodass auf diesen Proben entsprechend geringere DNA-Gehalte nachweisbar waren. Für die TRAP-Aktivitäten der Osteoklasten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Die CAII-Aktivität der Osteoklasten auf Proben, die vor der Zellbesiedlung ohne hiFCS inkubiert wurden, ist an Tag 9 signifikant höher als bei den vorbehandelten Proben. An Tag 16 hingegen liegt kein signifikanter Unterschied zwischen den Probengruppen vor. Aufgrund dieser Daten wurde entschieden, in den folgenden Experimenten auf eine Vorbehandlung der mineralisierten Kollagentapes mit hiFCS-haltigem Medium zu verzichten.

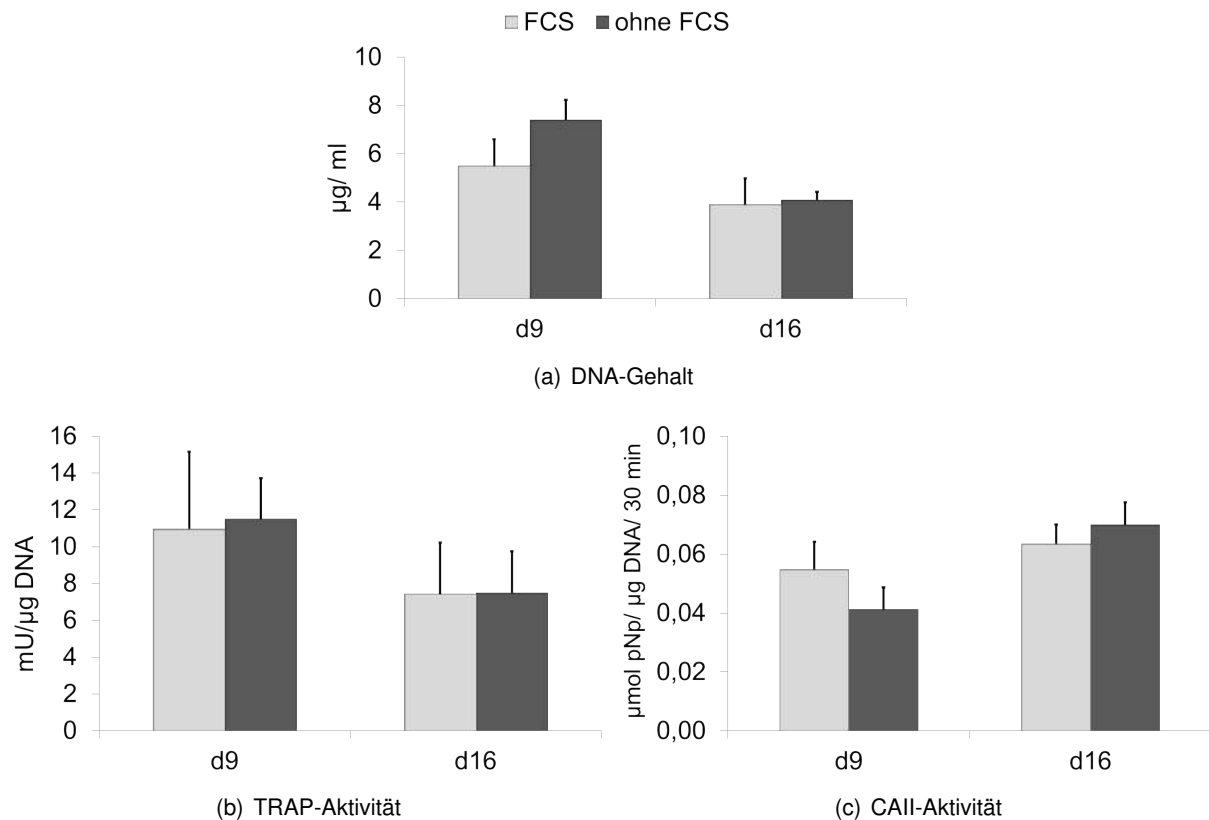


Abbildung 4.4.: DNA-Gehalt, TRAP- und CAII-Aktivität von Osteoklasten (Spender H mit n=5) nach 16 Tagen Kultivierung unter Stimulation mit M-CSF und RANKL auf mineralisiertem Kollagentape mit (hellgrau) und ohne (dunkelgrau) Vorbehandlung mit hiFCS-haltigem Medium. Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen.

4.4. Untersuchung zum Einfluss des HA-Gehaltes der mineralisierten Kollagentapes auf die Osteoklastogenese

Osteoklasten *in vivo* bauen Knochenmatrix ab, indem sie zuerst die mineralische Phase mittels Generierung eines sauren pH-Milieus auflösen und anschließend die organische Komponente degradieren (Teitelbaum, 2000a). Der Mineralgehalt der anorganischen Matrix könnte dabei einen Einfluss auf die Resorptionsaktivität der Zellen haben. Chambers et al. kultivierten primäre Osteoklasten aus Kaninchenknochen *in vitro* auf Knochenscheiben, die zuvor unterschiedlich präpariert wurden. Ein Teil der Proben wurde unbehandelt belassen und besiedelt, enthielt also sowohl organische als auch anorganische Knochenmatrix. Bei der zweiten Probengruppe wurde vor der Besiedlung mittels Hydrazin die organische Matrixkomponente entfernt (anorganische Knochenproben). Die dritte Probengruppe wurde mittels Salzsäure demineralisiert und ebenfalls anschließend mit Osteoklasten besiedelt. Diese Proben wurden drei Tage kultiviert um anschließend die Resorptionsaktivität zu quantifizieren. Die Oberflächen des unbehandelten und des anorganischen Knochens wiesen bei der Untersuchung typische Resorptionslakunen auf. Das Gesamtvolumen der resorbierten Areale auf anorganischem Knochen war dabei deutlich größer, als auf unbehandeltem. Zudem unterschied sich die Morphologie der Resorptionslakunen auf den beiden Oberflächen. Unbehandelter Knochen zeigte intermittierend scharf begrenzte, resorbierte Areale. Auf der anorganischen Oberfläche zeigten sich hingegen durchgehend resorbierte Areale beziehungsweise Pfade, was auf einen kontinuierlichen Resorptionsprozess schließen lässt. Auf demineralisiertem Knochen wurde, verglichen mit beiden anderen Probenarten, eine signifikant geringere Anzahl adhärenter Osteoklasten beobachtet. Dies führt zu der Annahme, dass Osteoklasten eine höhere Affinität zu mineralisierten Oberflächen haben. Zudem konnten auf den demineralisierten Proben nach der Kultivierungsphase keine Resorptionslakunen oder andere Veränderungen festgestellt werden (Chambers et al., 1984). Die Ergebnisse der Gruppe deuten darauf hin, dass der Kontakt von Osteoklasten mit mineralisierter Matrix ein Stimulus für Resorptionsaktivität ist. Kontakt der Zellen mit Knochenmineral führte zur Resorption, wurde hingegen das Mineral entfernt, fand anschließend keine Resorption statt. Eine Entfernung der organischen Phase des Knochens führte zu einer gesteigerten Resorptionsaktivität der Osteoklasten. Zudem schien der Resorptionsprozess auf anorganischer Oberfläche kontinuierlich statt intermittierend stattgefunden zu haben. Somit lässt sich schlussfolgern, dass anorganischer Knochen die Resorptionsaktivität möglicherweise stärker stimuliert (Chambers et al., 1984).

Reid et al. kultivierten primäre Osteoklasten aus Hühnerknochen auf humanen Knochenscheiben und untersuchten den Einfluss des Mineralisierungsgrades des Knochens auf das Resorptionsverhalten der Zellen. Unabhängig vom Mineralisierungsgrad zeigten sich in jedem Bereich der Proben Resorptionslakunen (Reid, 1986). Es konnte zudem ein Trend zu einer gesteigerten Fläche individueller Resorptionskomplexe auf Knochen mit höherem Mineralisierungsgrad festgestellt werden. Diese Ergebnisse waren jedoch nicht statistisch signifikant (Reid, 1986). Auch Jones et al. untersuchten die Resorption von primären Säuger-Osteoklasten auf Osteonen mit verschiedenem Mineralisierungsgrad. Es konnten ähnliche Resorptionsaktivitäten festgestellt werden. Die Daten zeigten, dass die Demineralisierung der Knochensubstanz durch Osteoklasten zunahm, wenn sich die Zellen auf einem Areal mit geringerem Mineralgehalt befanden. Die Demineralisierungsrate von Knochenmatrix während der osteoklastären Resorption (bezogen auf Tiefe pro Zeiteinheit) stand in inverser Beziehung zum Mineralgehalt des Knochens (Reid, 1986). In anderen Experimenten wurde gezeigt, dass

4. Ergebnisse und Diskussion

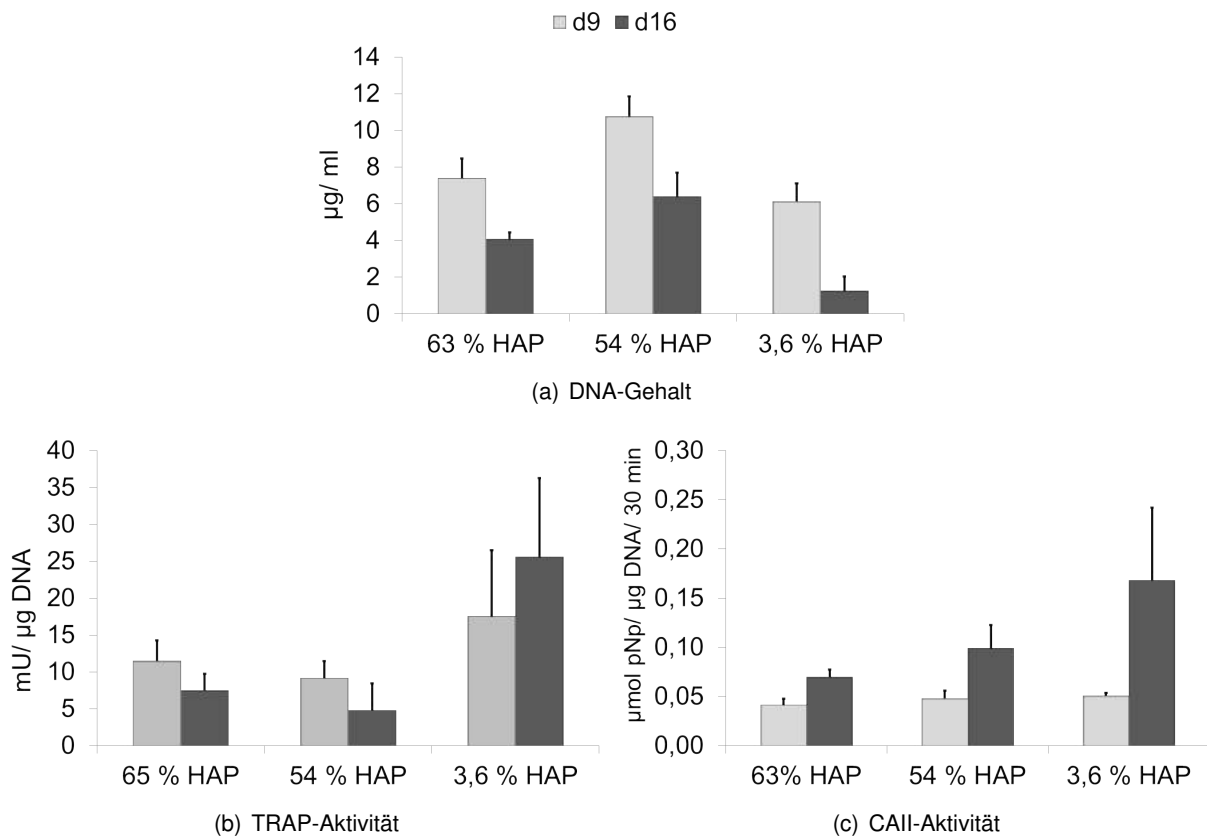


Abbildung 4.5.: DNA-Gehalt, TRAP- und CAII-Aktivität von Osteoklasten (Spender H mit n=5) auf Tapes mit unterschiedlichem Hydroxylapatitgehalt (HA-Gehalt) nach 9 Tagen (hellgrau) und nach 16 Tagen (dunkelgrau) Kultivierung unter Stimulation mit M-CSF und RANKL. Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen.

auch unmineralisierte Matrix von Osteoklasten resorbiert wird (Jones et al., 1984; Reid, 1986; Rumppler et al., 2012).

In dem in dieser Arbeit durchgeführten und hier beschriebenen Experiment sollte der Einfluss des Mineralgehalts der membranähnlichen mineralisierten Kollagentapes auf die Entwicklung und das Resorptionsverhalten von Osteoklasten untersucht werden. Die in der Arbeitsgruppe hergestellte Standardtapes besitzen einen Hydroxylapatitgehalt von 60 bis 65 %. Dies entspricht in etwa dem Mineralgehalt menschlichen Knochens. Zudem wurden im durchgeführten Experiment Tapes mit einem HA-Gehalt von 54 % beziehungsweise 3,6 % verwendet. Der Mineralgehalt der Proben wurde zuvor mittels Glühverlust bestimmt. Alle Proben wurden mit Monozyten besiedelt und 16 Tage wie unter Abschnitt 3 beschrieben kultiviert. Proben für biochemische Analysen wurden jeweils zum Zeitpunkt d9 und d16 entnommen. Abbildung 4.5 zeigt den DNA-Gehalt (a) der Zellen sowie die Aktivität von TRAP (b) und CAII (c) der Osteoklasten auf mineralisiertem Kollagentape in Abhängigkeit vom HA-Gehalt.

Der HA-Gehalt der mineralisierten Kollagentapes hat signifikanten Einfluss auf den gemessenen DNA-Gehalt der Proben. Hinsichtlich der gemessenen DNA-Gehalte unterschieden sich zum Zeit-

4.4. Untersuchung zum Einfluss des HA-Gehaltes der mineralisierten Kollagentapes auf die Osteoklastogenese

punkt d9 die Messergebnisse der Proben mit einem HA-Gehalt von 54 % signifikant ($p < 0,05$), sowohl vom DNA-Gehalt der Osteoklasten auf Standardtape, als auch vom DNA-Gehalt der Osteoklasten auf Tape mit einem HA-Gehalt von 3,6 %. An Tag 16 zeigten sich signifikante Unterschiede der DNA-Gehalte aller Proben, wobei Tape mit einem HA-Gehalt von 3,6 % den geringsten und Tape mit 54 % HA-Gehalt den höchsten DNA-Gehalt aufwies ($p < 0,05$, siehe Abb. 4.5 (a)). Die TRAP-Aktivitäten der Osteoklasten zeigten an Tag 9 keine signifikanten Unterschiede. Die Messwerte an Tag 16 hingegen zeigten eine signifikant höhere TRAP-Aktivität der Osteoklasten auf Tape mit einem HA-Gehalt von 3,6 % im Vergleich zu den Messdaten der Osteoklasten auf Standardtape sowie auf Tape mit 54 % HA-Gehalt ($p < 0,05$, siehe Abb. 4.5 (b)). Betrachtet man die Aktivitäten der Carboanhydrase II, so zeigten sich an Tag 16 signifikant höhere Werte der Osteoklasten auf Tapes mit einem HA-Gehalt von 3,6 % verglichen mit den Messdaten der Zellen auf den beiden anderen Probenarten ($p < 0,05$, siehe Abb. 4.5 (c)). Die Signifikanzen sind in Abbildung 4.5 aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet.

Die Herstellung von Tapes mit einem Mineralgehalt abweichend von den standardmäßigen 60 bis 65 % ist äußerst schwierig, da eine reine stöchiometrische Berechnung und Anwendung auf den Herstellungsprozess nicht zum zuvor kalkulierten Ergebnis führt. Eine wiederholte Herstellung von Tapes mit genau 54 % beziehungsweise 3,6 % HA-Gehalt war daher nicht möglich. Zudem ist der Einsatz von Tapes mit 3,6 % HA-Gehalt für *in vitro* Experimente sehr schwierig, da sie aufgrund ihrer geringen Dicke und Stabilität beim Mediumwechsel oder bei der biochemischen Analyse nach Beendigung der Zellkultivierung schnell zerstört werden und somit der Erhalt genauer Messergebnisse erschwert wird. Um den Einfluss des Mineralgehalts auf die Osteoklastogenese und das Resorptionsverhalten von Osteoklasten zu untersuchen, sollte dieser Versuch wiederholt werden. Erstrebenswert wäre es, dann mineralisierte Tapes mit schrittweise absteigendem Mineralgehalt zu verwenden.

4.5. Einfluss der Oberflächenbeschaffenheit auf die Osteoklastogenese

Monozyten können auf verschiedenen Materialien adhären, darunter Glas, Plastik, Knochen, Dentin oder Kristalle verschiedener chemischer Zusammensetzung (Kalziumapatit, Kalziumkarbonat etc.) (Jones et al., 1984; Razzouk et al., 1999; Pfaff und Jurdic, 2001; Saltel et al., 2004). Besonders im Bereich der Entwicklung von Implantaten ist es wichtig, das Verhalten von Osteoklasten auf verschiedenen Oberflächen zu untersuchen. Nur dadurch wird es möglich beispielsweise Knochenimplantate so zu optimieren, dass sie sich in den Remodellingprozess des menschlichen Körpers einfügen, das heißt von den Osteoklasten abgebaut und durch Ablagerung körpereigener Knochensubstanz ersetzt werden. Das Verhalten der Osteoklasten auf Knochenimplantatoberflächen wird von physikalischen und chemischen Eigenschaften der Biomaterialoberfläche beeinflusst (beispielsweise Rauigkeit oder chemische Vorbehandlung der Oberflächen) (Gomi et al., 1993; Marchisio et al., 2005; Wennerberg und Albrektsson, 2009). Die Rauigkeit der Strukturoberflächen hat beispielsweise Einfluss auf die Adhärenz und das Differenzierungsverhalten beziehungsweise die Aktivität differenzierter Osteoklasten und wurde in der Vergangenheit bereits von einigen Forschungsgruppen untersucht (Saltel et al., 2004).

Durch die Adhärenz der Monozyten auf unterschiedlichen Materialien bilden sie verschiedene Aktinstrukturen aus. Während der Differenzierung zum reifen und aktiven Osteoklasten werden von den Zellen Podosomen gebildet (Pfaff und Jurdic, 2001). Diese Podosomen findet man bei Osteoklasten in allen Differenzierungsstadien. Mit steigendem Differenzierungsgrad zum resorbierenden Osteoklasten nimmt die Dichte an Podosomen am Zellrand zu (Pfaff und Jurdic, 2001). Während der Resorptionsprozess beginnt, polarisieren sich die Osteoklasten auf der Knochenoberfläche apiko-basal mit spezifischen Submembrandomänen und formen die *sealing zone* (Vaananen et al., 2000; Mulari et al., 2003). Wenn Osteoklasten auf Plastik oder Glas ausgesiedelt werden, dann ist F-Aktin in Form von Podosomen organisiert (Pfaff und Jurdic, 2001). Der Unterschied zwischen Podosomengürtel und Aktinring sowie deren Ausbildung wird von verschiedenen Forschungsgruppen diskutiert. Fuller et al. beschreiben den Podosomengürtel als eine diskontinuierliche Reihe adhärenter Punkte, dessen Durchmesser größer sei als von Aktinringen. Die Gruppe fand heraus, dass die Bildung von Podosomengürteln eng mit der Resorptionsaktivität von Osteoklasten korreliert (Fuller et al., 2010). Saltel et al. verglichen die Morphologie von Osteoklasten auf Glas, Dentin und Apatit. Reife Osteoklasten auf Glas wurden als große, flache Zellen mit einem geschwollenen Areal im Bereich der Podosomen beschrieben (Saltel et al., 2004). Osteoklasten auf Dentin oder Apatit kontrahierten sich, Saltel et al. beschrieben einen rundlichen, kuppelartigen Phänotyp mit apiko-basaler Polarisierung. Diese Zellen sind in der Lage, Matrix zu resorbieren (Saltel et al., 2004). Zudem wurden Osteoklasten auf Glas etwa vier Mal größer als auf Apatit, allerdings waren sie nur halb so dünn. Ein voll differenzierter Phänotyp mit *sealing zone* und apiko-basaler Polarisierung konnte scheinbar nur in Anwesenheit mineralisierter Matrix entwickelt werden (Saltel et al., 2004). Geblinger et al. untersuchten den Einfluss der Oberflächenrauigkeit auf die Formierung der osteoklastären Aktinstrukturen und auf die Bildung der *sealing zone*. Osteoklasten auf glatten Kalzitoberflächen formten in dem durchgeführten Experiment kleine instabile Ringe, auf rauer Oberfläche hingegen bildeten sich große, stabile, periphere *sealing zones* (Geblinger et al., 2010). Fuller et al. beschrieben Aktinstrukturen, die sich auf rauerer Oberflächen bildeten, als kleiner, aber dicker als solche, die auf glatteren Oberflächen gebildet wur-

den. Eine raue Oberfläche induziert demnach die Bildung von Aktinringen, die denen auf natürlichem Knochen ähneln (Fuller et al., 2010).

Mit dem von unserer Gruppe entwickelten mineralisierten Kollagentape wurde ein Versuchsaufbau generiert, mit dem ebenfalls der Einfluss verschiedener Oberflächenrauigkeiten auf die Osteoklastogenese und die Aktivität osteoklastenspezifischer Enzyme untersucht werden konnte. Aus diesem Grund wurde versucht, ein möglichst glattes mineralisiertes Kollagentape als Vergleichsmaterial zum Standardtape herzustellen. Bei der Herstellung des glatten Tapes wurde das Material nicht wie beim Standardtape auf einer Fritte mittels Vakuum getrocknet, sondern das Kollagengemisch wurde zwischen zwei Petrischalen gegeben und an der Luft getrocknet. Durch die Bestimmung des Glühverlustes konnte gezeigt werden, dass auch die glatten Tapes einen HA-Gehalt von ca. 63 % aufwiesen und sich somit vom Standardtape nur durch eine glattere Oberfläche unterschieden. Sowohl Standardtape als auch glattes Tape wurde mit Monozyten besiedelt. Für die biochemische Bestimmung des DNA-Gehalts sowie der Enzymaktivitäten von TRAP und CAII wurden Proben sowohl nach 9 als auch nach 16 Tagen Kultivierung entnommen. Die Analyse der Zelllysate erfolgte wie unter Material und Methoden (Abschnitt 3) beschrieben.

Die Anzahl verfügbarer Tapes mit glatter Oberfläche war leider nicht ausreichend, um ebenfalls Messdaten für den Zeitpunkt d9 zu erfassen. Eine Wiederholung des Experiments war aufgrund mangelnder Reproduzierbarkeit der glatten mineralisierten Kollagentapes nicht möglich. Es wurde ein zweiter Versuch durchgeführt, bei dem mit Hilfe verschiedener Techniken weitere glatte Tapes hergestellt wurden (Daten nicht gezeigt). Diese Tapes unterschieden sich in ihren Eigenschaften jedoch sehr stark von den zuerst getesteten Proben und somit sind diese Versuchsergebnisse nicht vergleichbar mit den in Abbildung 4.7 dargestellten. Abbildung 4.7 zeigt, dass die Enzymaktivität der Zellen auf glatten Tapes vergleichbar war mit der Aktivität auf Standardtape. Statistisch ergeben sich hinsichtlich DNA-Gehalt, TRAP-Aktivität und CAII-Aktivität keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Proben. Hinsichtlich der Morphologie zeigten sich auf glattem Tape deutlich größere mehrkernige Osteoklasten als auf Standardtape (Abb. 4.6 (a)). Zudem konnten auf dem glatten Tape mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie Resorptionslakunen nachgewiesen werden (Abb. 4.6 (b)). Der Nachweis der Resorptionslakunen auf rauem Tape gestaltet sich sehr schwierig, da ihre Messung immer relativ zur Umgebung durchgeführt wird. Durch die sehr unregelmäßige Oberfläche des Standardtapes kann daher nicht zwischen produktionsbedingten tieferen Bereichen und resorbierten Arealen unterschieden werden. Da die Resorptionslakunen nur eine sehr geringe Tiefe haben, muss der ursprüngliche Untergrund möglichst glatt sein. Für eine Quantifizierung ist eine Rauigkeit von unter 1 μm optimal, um zwischen zuvor bestandenen strukturellen Unebenheiten und neu geformten Resorptionspits unterscheiden zu können (Zhang et al., 2012).

Hinsichtlich des in dieser Arbeit untersuchten Einflussfaktors der Rauigkeit von Oberflächen auf die Osteoklastogenese und Resorptionsaktivität der Zellen gibt es bereits unterschiedliche Erkenntnisse verschiedener Forschungsgruppen. Gesunder Knochen hat eine Körnung von unter 100 nm im Durchmesser (Webster et al., 2001). Die Gruppe Webster et. al untersuchte die Aktivität von Osteoklasten anhand der TRAP-Aktivität, sowie anhand der Entstehung von Resorptionslakunen auf Tonerde (Alumina) und Hydroxylapatit mit einer Körnung von unter 100 nm (im Folgenden als nanophasisch benannt). Auf den nanophasischen Oberflächen wurde eine höhere TRAP-Aktivität nachgewiesen als auf den konventionellen Keramikoberflächen. Auch das Auftreten von Resorptionspits war auf nanophasischen Keramiken signifikant höher als bei konventionellen Keramiken (Webster et al., 2001).

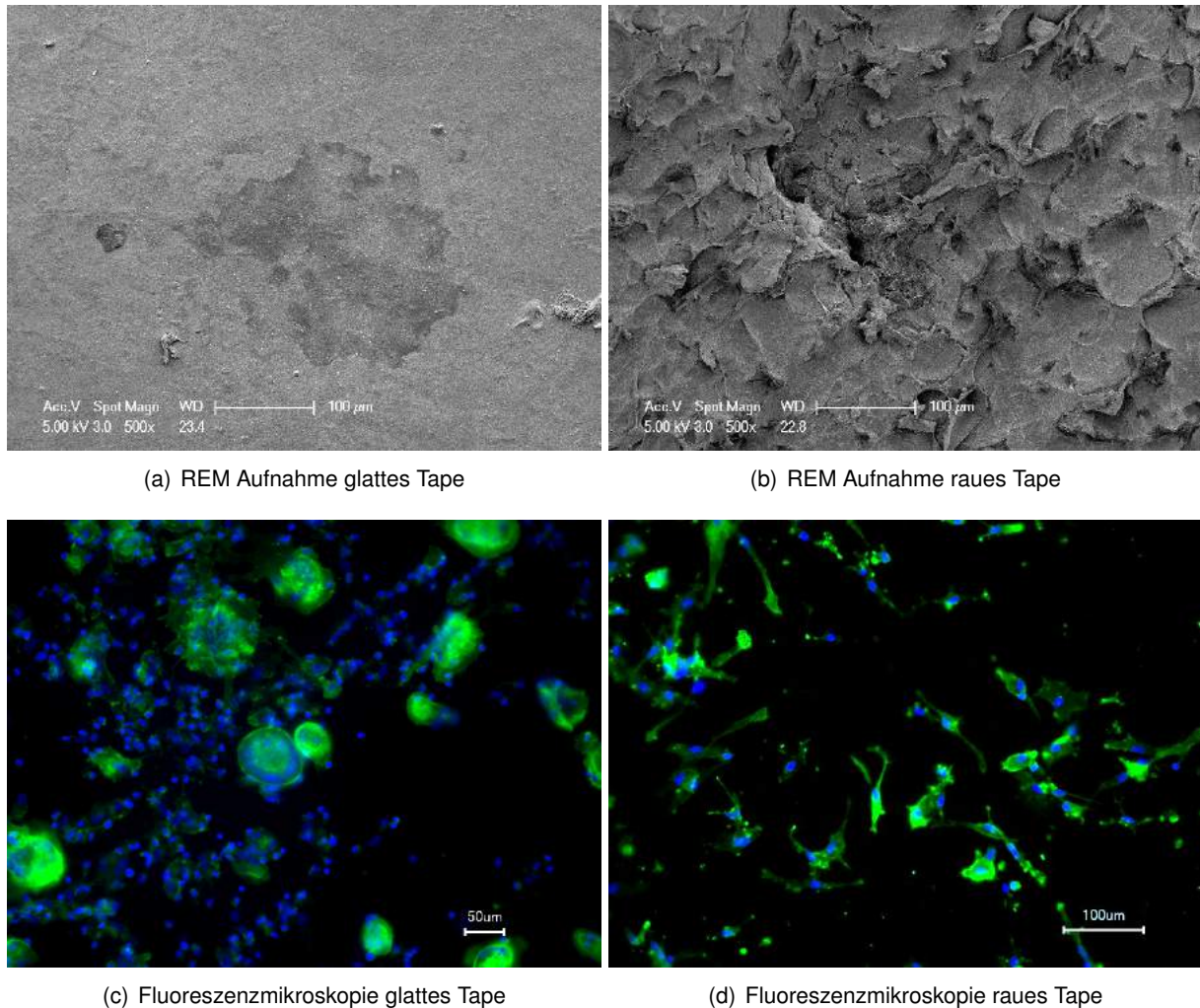


Abbildung 4.6.: Osteoklastogenese und Oberflächenstruktur auf glattem Tape (a und c) und auf rauem Tape (b und d) nach 16 Tagen Kultivierung unter Stimulation mit M-CSF und RANKL. Maßbalken entsprechen 50 µm (in c) und 100 µm (in a, b und d). Für die REM-Aufnahmen wurden die Osteoklasten mit Hilfe von 1 % Triton™ von den mineralisierten Kollagentapes entfernt. Abb. (a) zeigt eine Resorptionslakune auf glattem Tape.

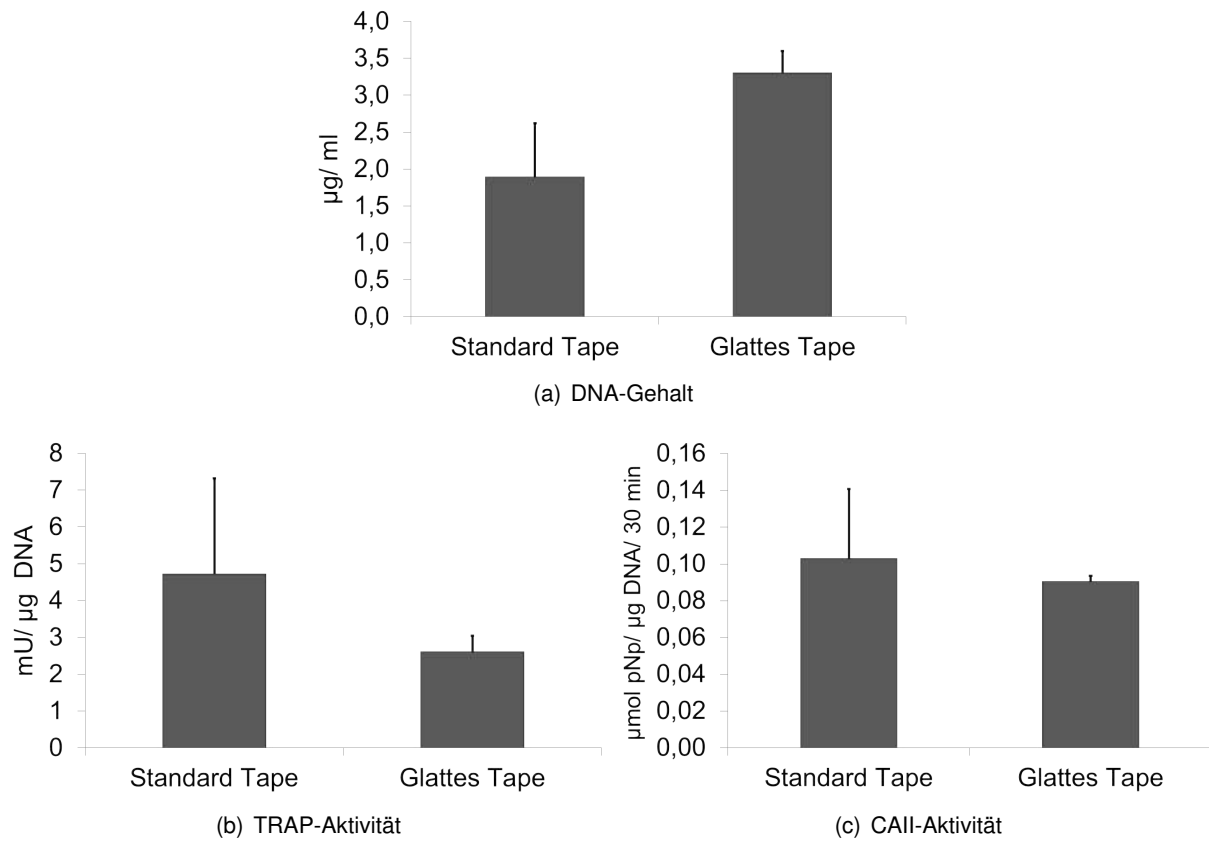


Abbildung 4.7.: DNA-Gehalt, TRAP- und CAII-Aktivität von Osteoklasten (Spender H mit $n=5$) auf Tapes mit unterschiedlicher Rauigkeit nach 16 Tagen Kultivierung unter Stimulation mit M-CSF und RANKL. Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen.

Die Gruppe Gomi et al. beobachtete, dass Resorptionslakunen in der Anzahl auf glatter Oberfläche signifikant häufiger nachzuweisen waren, als auf rauer Oberfläche. Allerdings war es, ebenso wie im hier beschriebenen Versuch, schwierig, zwischen zellvermittelten Resorptionslakunen und Artefakten auf den rauen Oberflächen zu unterscheiden. Die Gesamtzellzahl sowie die Anzahl TRAP-positiver Zellen war hingegen auf Proben mit rauerer Oberfläche, verglichen mit glatteren Proben, höher (Gomi et al., 1993). Große TRAP-positive Zellen wurden signifikant häufiger auf rauer als auf glatter Oberfläche beobachtet. Sie schienen die Oberfläche zu degradieren. Diese Annahme konnte durch gesteigerte Rauigkeit und Mikroporosität in unmittelbarer Nachbarschaft der Zellen unterstützt werden. Allerdings wurden keine definitiven Resorptionslakunen durch diese multinuklearen TRAP-positiven Zellen gebildet. Auf den Proben mit glatten Oberflächen konnten hingegen keine großen multinuklearen TRAP-positive Zellen, sondern mehr kleinere, TRAP-positive Zellen nachgewiesen werden. Generell entstanden auf allen Oberflächen Resorptionslakunen mit variierender Tiefe und Fläche (Gomi et al., 1993).

Marchisio et al. siedelten Zellen der murinen Zelllinie RAW 264.7 auf Glas (Kontrolle) und auf bearbeiteten Titanoberflächen mit zwei verschiedenen Rauigkeiten und ließen sie zu Osteoklasten differenzieren. Zellen auf der glatteren Titanoberfläche zeigten eine höhere Adhärenz als Zellen auf der rauerer Titanoberfläche, jedoch differenzierten die Zellen auf der rauerer Oberfläche, im Vergleich mit den glatteren, besser (Marchisio et al., 2005). Betrachtet man die Ergebnisse des hier durchgeführten Versuchs, kann man ähnliche Ergebnisse feststellen. Obwohl statistisch nicht signifikant, ergab sich doch ein höherer DNA-Gehalt bei den Proben des glatten Tapes als bei denen des Standardtapes (siehe Abb 4.7 (a)). Dies deutet darauf hin, dass die Monozyten nach der Besiedlung der Proben besser auf der glatteren Oberfläche adhäreren konnten. Über die Resorptionsaktivität der Osteoklasten auf Standardtape ließ sich nur schwer eine Aussage treffen, da sich Resorptionslakunen nicht quantifizieren ließen und auch hinsichtlich der Enzymaktivitäten keine deutlichen Unterschiede zwischen den Proben erkennbar waren.

Die Gruppe John et al. kultivierten Osteoklasten auf bioglasähnlichem feinkörnigem, transparentem Hydroxylapatit mit einer Rauigkeit von $R_a = 0,064$ (verglichen dazu hat Zellkultur-Polystyrol eine Rauigkeit von $R_a = 0,08$). Die Kultivierung von Osteoklasten war erfolgreich, es konnten mikroskopisch mehrkernige Zellen mit osteoklastentypischen Aktinringen nachgewiesen werden (John et al., 2009). Matsunaga et al. besiedelten und inkubierten bovine kortikale Knochenscheiben unterschiedlicher Rauigkeit mit Osteoklasten aus Rattenknochen. Anschließend wurden Anzahl und Fläche der entstandenen Resorptionsgruben untersucht. Es wurde festgestellt, dass die Oberflächenrauigkeit von Knochen eine entscheidende Rolle in der osteoklastären Knochenresorption spielt. Die Anzahl an Osteoklasten war auf beiden Oberflächenbeschaffenheiten gleich. Es wurde also kein Unterschied in der Fähigkeit zur Adhärenz an der Oberfläche festgestellt. Resorptionspits und die Gesamtfläche von Vertiefungen war hingegen auf den rauen Oberflächen nach drei Tagen zweifach oder mehr höher als auf glatter Oberfläche. Diese Studie zeigt, dass Knochenresorption auf rauer Oberfläche stärker ist als auf glatter Oberfläche. Eine mittlere Oberflächenrauigkeit von $1 \mu\text{m}$ stellte sich als optimal heraus, hier zeigten die Osteoklasten die höchste Resorptionsaktivität. Bei Rauigkeiten über diesem Wert wurden geringere Aktivitäten erreicht, jedoch höhere als bei glatter Oberfläche. (Matsunaga et al., 1999). Die Gruppe Costa-Rodrigues et al. verglich die Differenzierung von PBMC, die auf Hydroxylapatit-scheiben mit drei verschiedenen Rauigkeiten ($R_a = 0,0437\text{--}0,582 \mu\text{m}$) kultiviert wurden. Es wurden die Genexpression von TRAP, CAII und Kathepsin K, sowie die TRAP-Aktivität im Zelllysate als osteoklas-

tenassoziierte Marker gemessen (Costa-Rodrigues et al., 2012). Die Arbeit zeigte, dass eine rauere Oberfläche die Osteoklastogenese unterstützen kann, wenn osteoklastenstimulierende Faktoren die Vorläuferzellen effektiv erreichen können. Daher scheint es, dass Osteoklastenvorläufer möglicherweise rauere Oberflächen detektieren können und dann zu reifen Osteoklasten differenzieren. Die Genexpression der Osteoklastenmarker war bei Zellen, die auf rauerer Oberfläche kultiviert wurden, höher als bei Zellen auf glatter Oberfläche (Costa-Rodrigues et al., 2012). Rumpler et al. untersuchten die Resorption von Osteoklasten auf Knochen und Dentin mit unterschiedlich rauer Oberfläche. Die Dentinproben hatten generell eine rauere Oberfläche als Knochen ($R_a = 15,14 \mu\text{m}$ und $3,75 \mu\text{m}$ auf Dentin, $R_a = 6,27 \mu\text{m}$ und $1,05 \mu\text{m}$ auf Knochen). Die Zelladhäsion war auf Dentin etwa 50 % höher als auf Knochen. Die Resorptionsaktivität war auf Dentin bis zu 11 mal höher als auf Knochen, ebenso die Anzahl der Resorptionspits. Bezüglich der untersuchten Parameter konnten hinsichtlich der Rauigkeiten, die hier verwendet wurden, keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Jedoch ist auf rauerer Oberfläche ein Trend zu höheren Werten erkennbar (Rumpler et al., 2013). Der Trend zu höheren Resorptionsaktivitäten von Osteoklasten auf rauerer Oberfläche, wie er von vielen Forschungsgruppen bestätigt wurde, kann mit dem im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten und hier beschriebenen Experiment nicht bestätigt werden. Allerdings wies das dabei eingesetzte mineralisierte Kollagentape eine deutlich rauere Oberfläche auf, als den von Matsunaga als optimal beschriebenen Wert von $1 \mu\text{m}$. Leider ist es mit den in der Arbeitsgruppe zur Verfügung stehenden Methoden bisher nicht möglich, die exakte Rauigkeit des Standardtapes zu bestimmen. Mit Sicherheit kann jedoch gesagt werden, dass das hier eingesetzte Standardtape wesentlich höhere Rauigkeitswerte aufwies als $1 \mu\text{m}$. Betrachtet man die Beobachtungen der Forschungsgruppen, die eine Abnahme der Osteoklastenaktivität bei einer diesen Wert übersteigenden Rauigkeit beschreiben, kann dies eine Erklärung für die in dieser Arbeit gemessenen relativ geringen TRAP- und CAII-Aktivitäten sein.

4.6. Einfluss des Spenders auf die Osteoklastogenese

In den Arbeiten verschiedener Autoren wird von einer hohen Variabilität im Resorptionsverhalten von Osteoklasten berichtet. Rumpler et al. vermuten als Ursache individuelle Voraussetzungen jedes Spenders. Demnach verhalten sich die Zellen verschiedener Spender unterschiedlich (Herrmann et al., 2007; Rumpler et al., 2013). In den Experimenten dieser Arbeit wurden Monozyten von insgesamt 7 Spendern auf Polystyrol (siehe Abb. 4.8 a, c, e) und von 6 Spendern auf mineralisiertem Kollagentape (Abb 4.8 b, d, f) kultiviert. Hierbei traten starke interindividuelle Schwankungen der Messergebnisse auf. Um diese Schwankungen zu verringern, können für Zellkulturexperimente zur Untersuchung des Resorptionsverhaltens von Osteoklasten beispielsweise Zelllinien wie die murine Zelllinie RAW 264.7 eingesetzt werden. Eine weitere Möglichkeit bietet das Poolen von Zellen verschiedener Spender. Dies wurde in einem weiteren Versuch durchgeführt (siehe dazu Abb. 4.9 im Abschnitt 4.7).

4. Ergebnisse und Diskussion

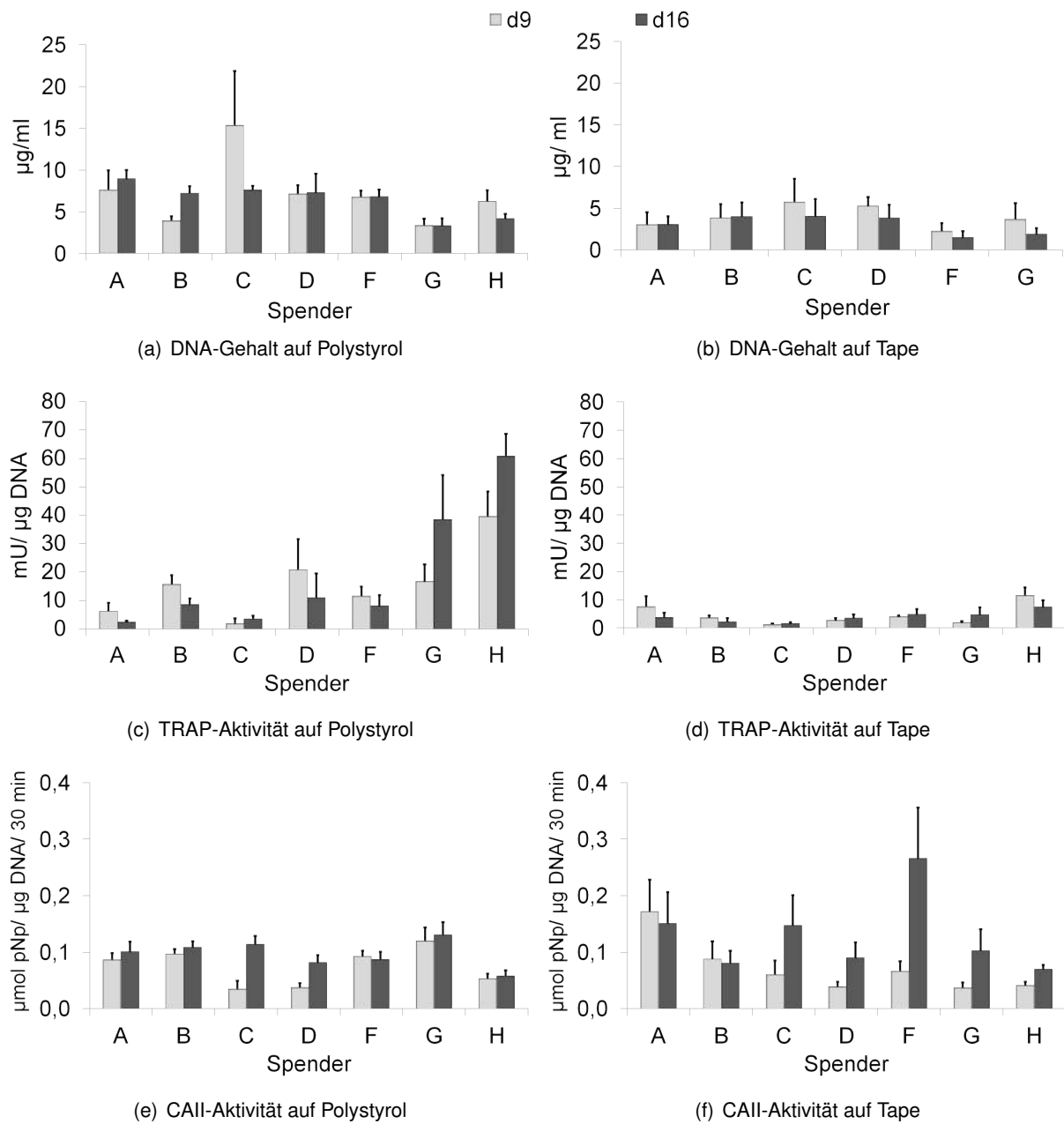


Abbildung 4.8.: DNA-Gehalt, TRAP- und CAII-Aktivität von Osteoklasten der Spender A bis H (je $n_x=5$) auf Polystyrol ((a), (c), (e)) und Tape ((b), (d), (f)) nach 9 Tagen (hellgrau) und nach 16 Tagen (dunkelgrau) Kultivierung unter Stimulation mit M-CSF und RANKL. Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen.

4.7. Einfluss des Poolens von Zellen verschiedener Spender auf die Osteoklastogenese

Im nachfolgend dargestellten Experiment wurden Proben mit Zellen von drei verschiedenen Spendern (A, B, C) jeweils separat (für jeden Spender $n = 5$), als auch mit gepoolten Zellen besiedelt ($n = 5$).

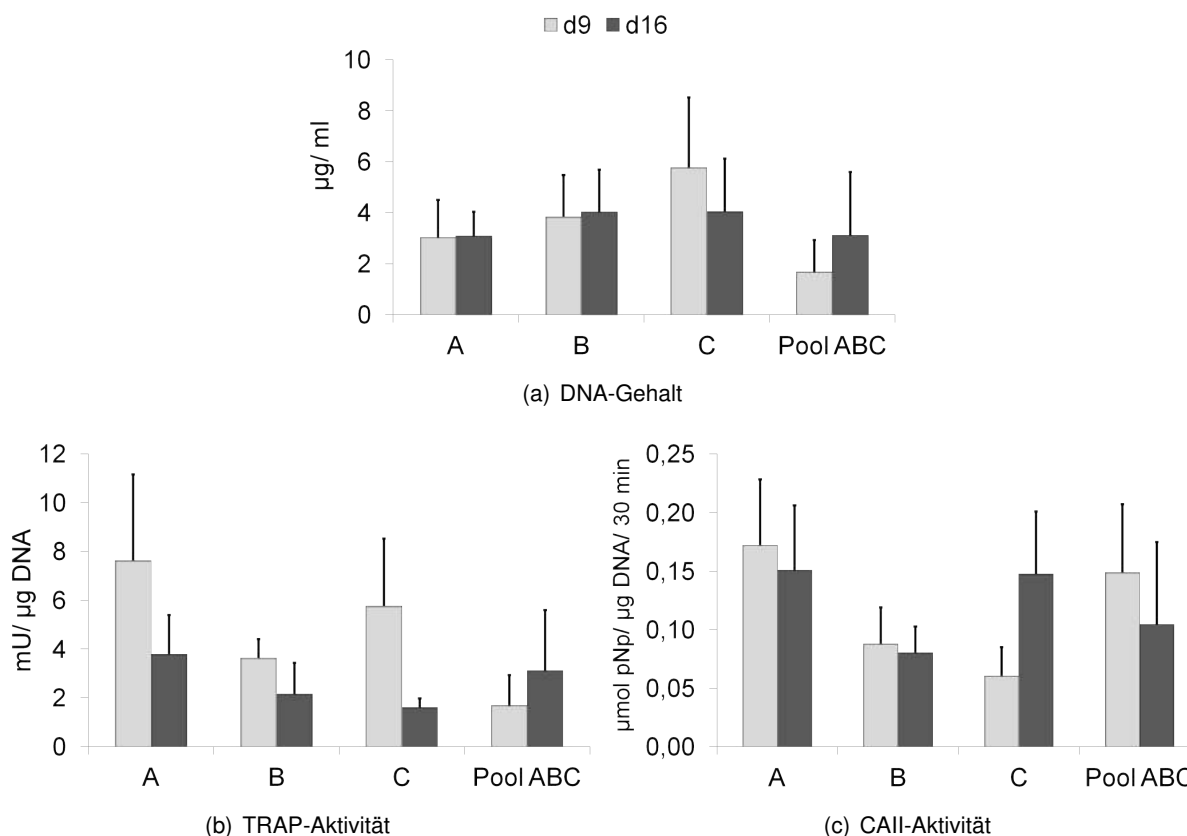


Abbildung 4.9.: Osteoklastogenese von PBMC der Spender A, B und C. Proben, die mit Zellen jeweils eines Spenders besiedelt wurden im Vergleich zu Proben, die mit Zellen aller drei Spender gemeinsam (gepoolt) besiedelt wurden. Messdaten nach 9 Tagen (hellgrau) und nach 16 Tagen (dunkelgrau) Kultivierung unter Zusatz von M-CSF und RANKL auf mineralisiertem Kollagentape. Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen.

Hinsichtlich des DNA-Gehaltes an Tag 9 zeigten die Osteoklasten der Proben, die mit gepoolten Zellen aller drei Spender besiedelt wurden, signifikant geringere Werte als die Proben, die nur mit Zellen von Spender C besiedelt wurden ($p < 0,05$). Zum Zeitpunkt d16 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des DNA-Gehaltes zwischen den mit Zellen von Einzelspendern und den mit gepoolten Zellen besiedelten Proben (siehe Abb. 4.9 (a)). Bezüglich der TRAP-Aktivität zeigten sich an Tag 9 signifikant höhere Werte für Spender A, verglichen mit dem Zellpool ($p < 0,05$). An Tag 16 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Proben (Abb. 4.9 (b)). Die CAII-Aktivität der gepoolten Zellen unterschied sich zu keinem Zeitpunkt signifikant von der CAII-Aktivität der Zellen

von Einzelspendern (Abb. 4.9 (c)). Tendenziell werden durch das Poolen von Zellen eher geringere Werte bei DNA-Gehalt und den Enzymaktivitäten erreicht. Zudem ist auffallend, dass sich die Trends im Verhalten der Einzelspender bei den gepoolten Zellen umkehren. Die TRAP-Aktivität nahm bei den Einzelspendern von Tag 9 zu Tag 16 ab, bei den gepoolten Zellen stieg sie hingegen an. Da das Experiment jedoch nur einmal durchgeführt werden konnte, können noch keine sicheren Aussagen zur Auswirkung des Poolens von Zellen auf die Osteoklastogenese getroffen werden. Dieses Experiment muss wiederholt werden, beispielsweise mit 5 bis 6 Einzelspendern, deren Zellen gepoolt werden. Stoddart et al. berichten über Vor- und Nachteile des Poolens von Zellen verschiedener Spender vor der Durchführung eines Experiments. Als Vorteil des Poolens nennt die Gruppe die Reduktion der Variabilität innerhalb und zwischen Experimenten. Manchmal kann es zudem nötig sein, Zellen verschiedener Spender zusammen zu fassen, da die Ausbeute an Zellen eines einzelnen Spenders ansonsten zu gering wäre. Bei längeren Experimenten, wie es beim *Tissue Engineering* häufig der Fall ist, ermöglicht das Poolen von Zellen die Durchführung eines großen Experiments mit vielen Kopien (Stoddart et al., 2012). Einer der größten Nachteile ist beispielsweise der Verlust der statistischen Power des durchgeführten Experiments. Um diesen Nachteil zu umgehen, schlagen Stoddart et al. die Durchführung mehrerer Experimente mit verschiedenen Spenderpools vor (Stoddart et al., 2012). Ein weiteres Risiko des Poolens von Zellen besteht zudem darin, dass das finale Ergebnis den Mittelwert sehr verschiedener Populationen darstellen kann. Dies führt dazu, dass eine Population beschrieben wird, die so nicht real existiert beziehungsweise die keinem der einzelnen Spender entspricht. Werden beispielsweise Zellen von Spendern gepoolt, von denen einer viel jünger ist als die anderen, wird dies erst deutlich, wenn man die Zellen der Spender einzeln für Experimente verwendet. Poolt man die Zellen, verliert sich diese Erkenntnis. Die Daten dreier einzeln, in von Stoddart et al. separaten Experimenten getesteten Zellen unterschieden sich stark von den Ergebnissen eines mehrfach durchgeführten Experiments mit gepoolten Zellen dieser Spender. Die Gruppe kam zu dem Schluss, dass klare Ergebnisse und maximale statistische Aussagekraft bei Experimenten am wahrscheinlichsten erreicht werden, wenn die Experimente mit Zellen eines einzelnen Spenders durchgeführt und danach mit mindestens drei Spendern wiederholt werden (Stoddart et al., 2012). Da die Erkenntnisse des hier beschriebenen Experiments mit denen der Gruppe Stoddart et al. hinsichtlich des Poolens von Zellen verschiedener Spender ähnlich sind, empfehle ich zukünftige Experimente ebenfalls mit mehreren Einzelspendern durchzuführen. Dadurch können interindividuelle Besonderheiten berücksichtigt werden und die Interpretation falscher Trends wird verhindert.

4.8. Einfluss des pH-Wertes auf die Osteoklastogenese

Biomaterialien besitzen die Eigenschaft, den pH-Wert ihrer unmittelbaren Umgebung zu verändern. Untersuchungen zum Einfluss des pH-Wertes auf die Entwicklung und Differenzierung von Osteoklasten sind daher wichtig, um beispielsweise beurteilen zu können, wie ein bestimmtes Material den Knochenstoffwechsel beeinflussen wird und ob es für den Einsatz *in vivo* geeignet ist. Der extrazelluläre pH-Wert des Zellkulturmediums wurde von verschiedenen Gruppen als ein wichtiger Einflussfaktor auf die Entwicklung und Funktion von Osteoklasten beschrieben (Biskobing und Fan, 2000; Schilling et al., 2004; Keller et al., 2012). Unter anderem ist beispielsweise bekannt, dass die Knochenresorption bei chronisch metabolischer Azidose erhöht ist (Arnett und Dempster, 1986; Carano et al., 1993; Nordström et al., 1997). Weiterhin wiesen Schilling et al. bei geringeren pH-Werten mehr als viermal so viele Osteoklasten nach, wie bei physiologischen pH-Wert-Bedingungen. Das Optimum lag dabei bei pH-Werten zwischen 6,9 und 7,1 ($p < 0,01$) (Schilling et al., 2004). Später konnte von der gleichen Gruppe eine signifikant positive Korrelation des extrazellulären pH-Wertes mit der Anzahl an Zellkernen pro Osteoklast und der Resorption des Biomaterials gezeigt werden (Keller et al., 2012).

Welchen Einfluss der extrazelluläre pH-Wert auf die Entwicklung und Aktivität von Osteoklasten hat, sollte ebenfalls in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten und im folgenden dargestellten Experimenten untersucht werden. Polystyrolproben sowie mineralisiertes Kollagentape wurden mit Monozyten besiedelt und über 16 Tage bei verschiedenen pH-Werten kultiviert. Um die unterschiedlichen pH-Werte zu erreichen, wurde Alphamedium mit verschiedenen Mengen Bikarbonat (Natriumhydrogencarbonat) versetzt. In Tabelle 4.2 sind die Medien mit den entsprechenden Mengen an zugesetztem Bikarbonat und dem dadurch erreichten pH-Wert aufgelistet.

Tabelle 4.2.: Bikarbonatzusatz der pH-Medien. Als Standardmedium wurde Flüssigmedium (Biochrom, F0925) verwendet, welches bereits 2,2 g/l Bikarbonat enthielt und einen pH-Wert von 7,2 aufwies. Die anderen Medien wurden separat aus Pulvermedium (Invitrogen) angerührt und durch Zugabe der entsprechenden Mengen Bikarbonat wurde der pH-Wert variiert.

Bezeichnung	Zusatz an Bikarbonat im Alphamedium	angestrebter pH-Wert
Standardmedium	–	7,2
M(2,2)	2,2 g/l Bikarbonat	6,9
M(1,0)	1,0 g/l Bikarbonat	6,6
M(0,5)	0,5 g/l Bikarbonat	6,4

Vorexperiment zur Untersuchung der Stabilität der eingestellten pH-Werte

Zunächst sollte die Entwicklung der eingestellten pH-Werte der Medien unter Zellkulturbedingungen untersucht werden. Die Medien wurden dafür ohne Zellen in einer 48 Well-Platte bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Zu den in Tabelle 4.3 gezeigten Zeitpunkten wurde der pH-Wert mittels eines pH-Meters unter der Zellkulturbank überprüft. Der Versuch wurde zweimal durchgeführt, um die Ergebnisse zu verifizieren. In den Überständen der unbesiedelten Proben konnte im Zeitverlauf ein pH-

Tabelle 4.3.: pH-Wert Studie unbesiedelter Proben

H ₂ CO ₃ -Konz. [g/l]	Zeitpunkt der Messung		
	d0	d1	d3
2,2	6,90	7,23	7,39
1,0	6,60	7,19	7,23
0,5	6,40	6,90	6,95
0,3	6,00	6,39	6,59

H ₂ CO ₃ -Konz. [g/l]	Zeitpunkt der Messung			
	d0	d2	d6	d9
2,2	6,90	7,29	7,24	7,49
1,0	6,60	7,04	7,06	7,28
0,5	6,40	6,76	6,76	6,86
0,3	6,00	6,44	6,41	6,52

Wert-Anstieg gezeigt werden (siehe Tab. 4.3).

Im Anschluss wurde der Versuch mit besiedelten Proben erneut durchgeführt, um das Verhalten der pH-Wert-Veränderung unter realen Zellkulturbedingungen zu überprüfen. In Abbildung 4.10 ist erkennbar, dass der pH-Wert der besiedelten Proben aufgrund der Stoffwechselaktivität der Zellen im Verlauf der Zeit tendenziell abnimmt.

Die Ergebnisse führen zu der Annahme, dass der pH-Wert nach initialem Anstieg durch die steigende Stoffwechselaktivität der Zellen absinkt und das angestrebte Ausgangsniveau näherungsweise wieder erreicht wird. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass der zuvor eingestellte pH-Wert trotz initialer Schwankungen unter Zellkulturbedingungen weitgehend konstant bleibt. Daher wurde entschieden, die Medien mit den unterschiedlichen Bikarbonatkonzentrationen für weitere Experimente einzusetzen. Durch den Einsatz der in Tabelle 4.2 dargestellten Bikarbonatmengen konnte eine angemessene Abstufung der pH-Werte der Medien erreicht werden. Somit konnten Zellen unter verschiedenen pH-Wert-Bedingungen kultiviert werden. Es sei darauf hingewiesen, dass die Medien in Anlehnung an die entsprechenden Bikarbonatkonzentrationen gekennzeichnet werden, da zum jeweils aktuellen pH-Wert-Verlauf des Versuchs keine Angaben gemacht werden konnten. Die Messung einer Probe dauert etwa 1 Minute, weshalb bei einem durchschnittlichen Probenaufkommen von 30 Proben pro Wellplatte eine für die Zellen hohe Belastung entsteht. Daher wurde die Messung der pH-Werte in den später durchgeführten Experimenten nicht mehr durchgeführt. Zudem sorgte die veränderte CO₂-Konzentration außerhalb des Inkubators während der Messung für einen Anstieg des pH-Wertes, was die Abbildung realer Werte verhindert. Eine Messung des pH-Wertes innerhalb des Inkubators war aufgrund fehlender technischer Geräte nicht möglich. Die Ergebnisse der Vorexperimente und die sich konstant verhaltenden Indikatorfarben der Zellkulturmedien wurden als ausreichende Nachweise angesehen, die pH-Werte der jeweils angesetzten Medien als annähernd konstant zu betrachten. Es wurde bereits von verschiedenen Gruppen gezeigt, dass die Inkubation von Proben in Medien mit unterschiedlichen pH-Werten vor der Besiedlung keinen Einfluss auf die spätere Ausbildung von Resorptionslakunen durch Osteoklasten hatte (Arnett und Dempster, 1986;

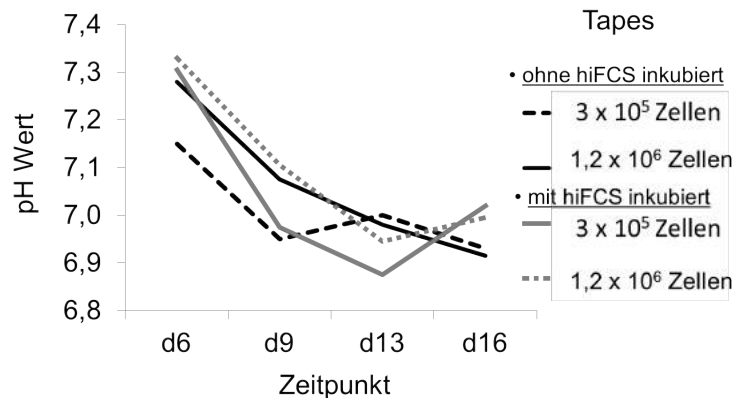


Abbildung 4.10.: pH-Wert-Änderung der Zellkulturüberstände von mit PBMC besiedelten Tapes (Spender H).

Carano et al., 1993). Daher wurden die Proben für die hier durchgeführten Zellkulturexperimente vor der Besiedlung nicht im entsprechenden pH-Medium vorinkubiert, sondern, wie in allen anderen Experimenten, in Inkubationsmedium.

Einfluss des pH-Wertes auf die Kalziumkonzentration im Zellkulturüberstand

Aufgrund ihrer Funktion als knochenabbauende Zellen spielen Osteoklasten ebenfalls eine wichtige Rolle in der Regulation des Kalziumhaushaltes des menschlichen Körpers. Aktive Osteoklasten bauen Knochen ab, indem sie zuerst die mineralische Phase des Knochens auflösen und anschließend die organische Substanz degradieren. Während des Resorptionsprozesses setzen die Osteoklasten Kalzium aus dem skelettalen Reservoir in den Extrazellulärraum frei (Neutzsky-Wulff et al., 2010; Reichert et al., 2013). Die extrazelluläre Kalziumkonzentration wiederum hat ebenfalls eine regulierende Wirkung auf die osteoklastäre Aktivität. Eine Anhebung der Kalziumkonzentration führt zu einer verminderten Resorptionsaktivität, indem die Protonenabgabe der Osteoklasten herunterreguliert wird (Sakai et al., 2010). Nach Beendigung des Resorptionsprozesses *in vivo* werden Osteoklasten aufgrund der angestiegenen extrazellulären Kalziumkonzentration in der Resorptionslakune apoptotisch (Negishi-Koga und Takayanagi, 2009). Aufgrund dieser Zusammenhänge kann die Messung der Kalziumkonzentration in Zellkulturüberständen von *in vitro* Experimenten als Marker für osteoklastäre Aktivität eingesetzt werden (Botelho et al., 2006; Neutzsky-Wulff et al., 2010; Reichert et al., 2013). Die Freisetzung von Kalzium in die Zellkulturüberstände durch Osteoklasten unter dem Einfluss von Kulturmedien mit verschiedenen pH-Werten wurde in folgendem Experiment untersucht. Die Überstände wurden jeweils zu den Zeitpunkten d6, d9, d13 sowie d16 entnommen und die Proben erhielten anschließend frisches Kulturmedium.

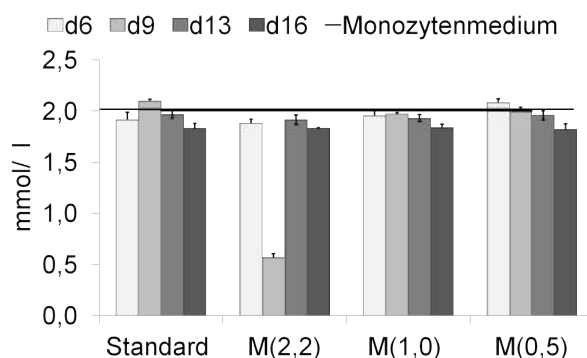


Abbildung 4.11.: Kalziumkonzentration im Überstand von mit PBMC (Spender G) besiedelten Polystyrolproben.

Abbildung 4.11 zeigt zunächst die Entwicklung der Kalziumkonzentrationen der Überstände auf mit Osteoklasten besiedelten Polystyrolproben, gemessen zu den angegebenen Zeitpunkten. Unabhängig vom pH-Wert des Mediums waren die Kalziumkonzentrationen der Medien dabei gleichbleibend hoch. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da Osteoklasten auf Polystyrol keine Resorption zeigen und es daher zu keinem Anstieg der Kalziumkonzentration im Kulturmedium kommen kann.

In Abbildung 4.12 wird die Entwicklung der Kalziumkonzentration der Zellkulturüberstände auf mineralisierten Kollagentapes dargestellt. Initial kam es, sowohl bei mit Osteoklasten besiedelten als auch bei unbesiedelten Proben zu einem starken Abfall der Kalziumkonzentration des Kulturmediums. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Kalziumkonzentrationen der Überstände unbesiedelter Tapes pH-Wert-abhängig veränderten (siehe Abb. 4.12 (a)). Der initiale starke Abfall der Kalziumkonzentration im Kulturmedium kann durch die Aufnahme von Kalziumionen durch das hydroxylapatithaltige mineralisierte Kollagentape erklärt werden. Mit fortlaufendem Zeitpunkt konnte ein Anstieg der in den Überständen gemessenen Kalziumkonzentrationen beobachtet werden. Dies könnte auf eine langsame Sättigung des mineralisierten Kollagentapes zurückzuführen sein, wodurch die Aufnahme der Kalziumionen aus dem Medium langsamer abläuft beziehungsweise zum Erliegen kommt.

Auf mit Osteoklasten besiedelten mineralisierten Kollagentapes konnte kein kontinuierlicher Anstieg der Kalziumkonzentrationen in den Zellkulturüberständen im Verlauf der Zellkultivierung beobachtet werden (siehe Abb. 4.12 (b)). Der initiale Abfall der Kalziumkonzentration war ebenfalls bei mit Zellen besiedelten Tapes zu beobachten. Sowohl bei besiedelten als auch unbesiedelten Proben wurde im folgenden Zeitverlauf pH-Wert-abhängig Kalzium wieder aus den Tapes gelöst. Ein Absinken des pH-Wertes förderte dabei das Herauslösen der Ionen aus den Bindungen, sodass höhere Konzentrationen messbar waren. Reichert et al. beschrieben in einer Arbeit ähnliche Ergebnisse (Reichert et al., 2013). Sie zeigten, dass die Kalziumkonzentration im Überstand von Osteoklastenkulturen auf Knochenersatzmaterial stark anstieg, was Rückschlüsse auf die Resorptionsaktivität zulässt. Auch bei Reichert et al. kam es beim Kontakt des reinen Kulturmediums mit dem Knochenersatzmaterial initial zu einem starken Abfall der Kalziumkonzentration im Medium. Anschließend stieg diese wieder kontinuierlich an. Bei Besiedlung des Materials mit Osteoklasten war ebenfalls zu Beginn ein Abfall der Kalziumkonzentration im Überstand zu verzeichnen. Nach kurzer Zeit jedoch stieg die Kalziumkonzentration wieder an. Als Ursache wurde der aktive Resorptionsprozess der Osteoklasten vermutet.

4.8. Einfluss des pH-Wertes auf die Osteoklastogenese

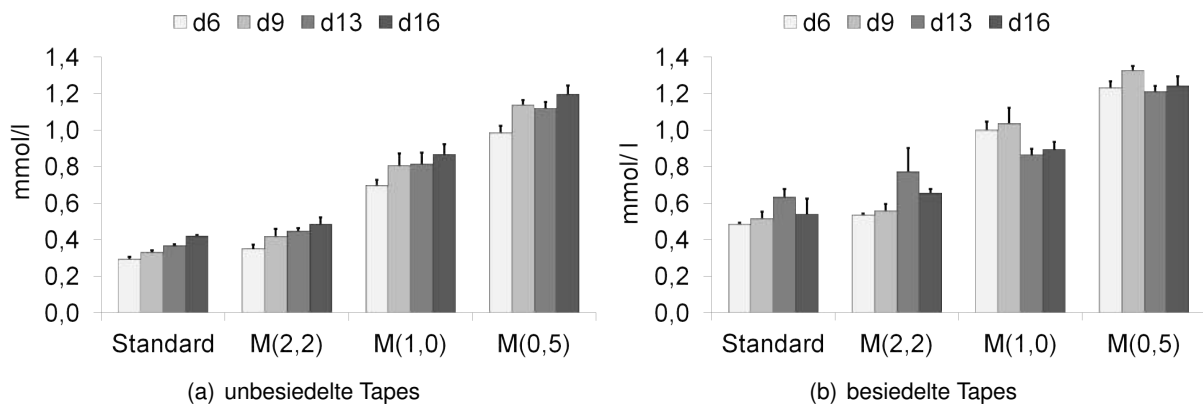


Abbildung 4.12.: Osteoklastogenese von PBMC (Spender F, n=5) über 16 Tage unter Stimulation mit M-CSF und RANKL. Vergleich zwischen den Kalziumkonzentrationen in Zellkulturüberständen unbesiedelter Tapes (a) und besiedelter Tapes (b).

(Reichert et al., 2013). Der scheinbar fördernde Einfluss eines sauren pH-Wertes auf die Herauslösung von Kalzium aus dem Material wurde ebenfalls von dieser Gruppe beschrieben. Unter Einfluss von verdünnter Salzsäure (pH 4,5) konnte eine kontinuierliche Freisetzung von Kalzium beobachtet werden (Reichert et al., 2013).

Es konnte in dem durchgeführten Versuch gezeigt werden, dass der pH-Wert einen Einfluss auf die Kalziumkonzentration im Überstand der Proben hat. Für eine Hemmung der osteoklastären Aktivität (Negishi-Koga und Takayanagi, 2009) waren die erreichten Konzentrationen jedoch zu gering, sodass die im Rahmen dieses Versuchs hergestellten pH-Medien für die Untersuchung von Osteoklasten eingesetzt werden konnten. Allerdings ist die Messung der Kalziumkonzentration als Marker für osteoklastäre Resorption nicht geeignet, wenn die Osteoklasten auf mineralisiertem Kollagentape kultiviert werden, da dieses Material wahrscheinlich das durch die Resorption in das Medium freigesetzten Kalzium wieder bindet und es somit nicht detektierbar ist.

Einfluss des pH-Wertes auf DNA-Gehalt und Enzymaktivitäten der Osteoklasten

In Abbildung 4.13 sind der DNA-Gehalt sowie die TRAP- und CAII-Aktivitäten osteoklastärer Zellen von fünf Spendern jeweils für die Kultivierung auf Polystyrol bzw. Tape dargestellt, wodurch ein direkter Vergleich zwischen den Zeitpunkten d9 und d16 ermöglicht wird. Hinsichtlich signifikanter Unterschiede der Messergebnisse kann aufgrund der großen interindividuellen Schwankungen keine globale Aussage getroffen werden. Bei der Auswertung der Diagramme sind jedoch Trends erkennbar, die im Folgenden interpretiert werden.

Betrachtet man den DNA-Gehalt der Proben auf Polystyrol sowie auf mineralisiertem Kollagentape, schien der pH-Wert des Mediums die Zellzahl nur geringfügig zu beeinflussen. Auf den Polystyrolproben war eine leichte Tendenz zu höheren DNA-Werten bei Medium M(2,2) erkennbar. Ein geringer pH-Wert, wie M(0,5), führte zu leicht geringere DNA-Mengen (siehe Abb. 4.13 (a)).

Die Messwerte des DNA-Gehaltes der Osteoklasten auf mineralisiertem Kollagentape zeigten keinen Trend zum Vorteil eines bestimmten pH-Mediums. Allerdings waren auch hier leicht geringere Mess-

4. Ergebnisse und Diskussion

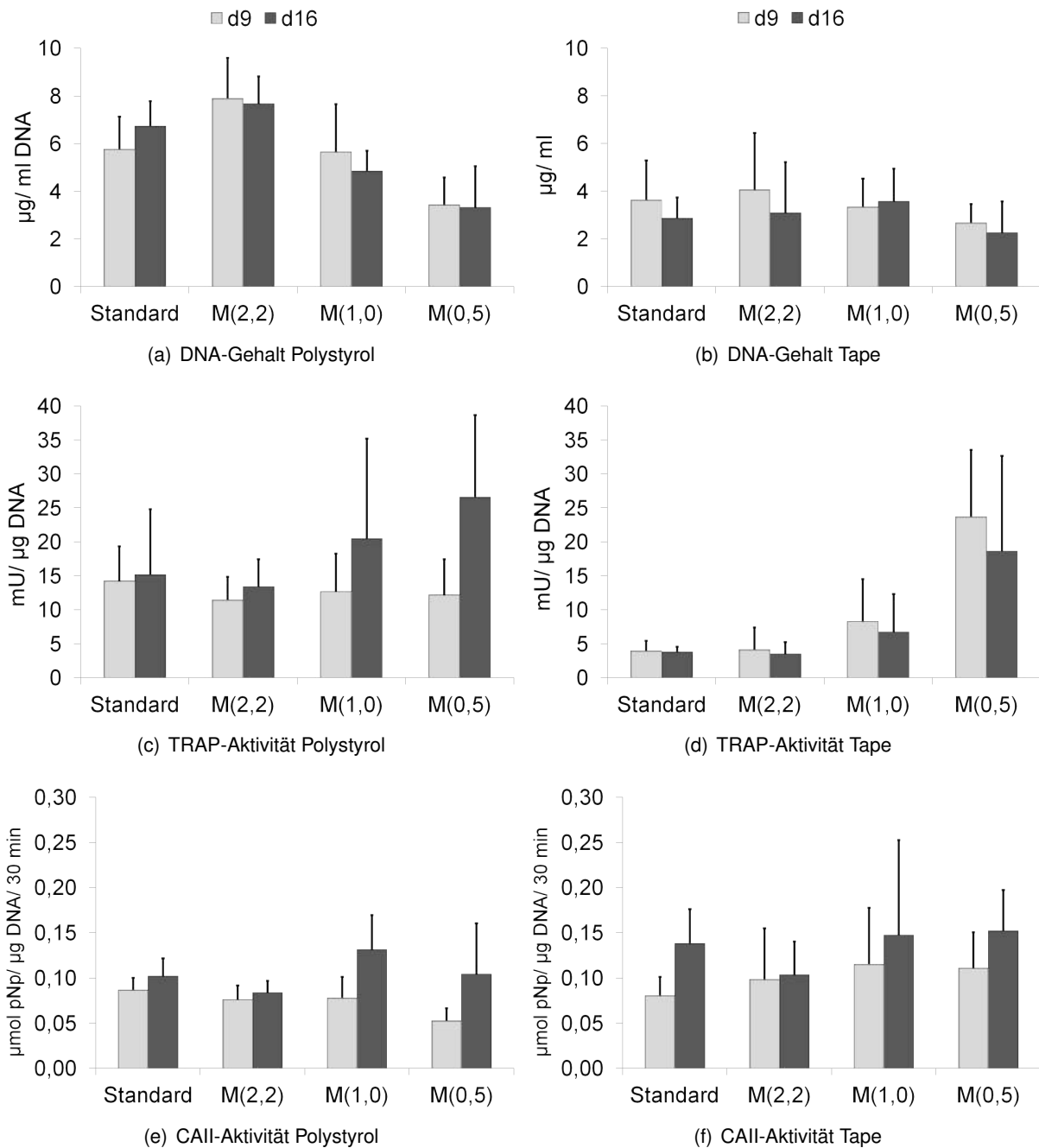


Abbildung 4.13.: DNA-Gehalt, TRAP- und CAII-Aktivität osteoklastärer Zellen von 5 Spendern (A, B, D, F und G; je $n_x=5$) mit $n=25$ (bzw. 4 Spendern (A, B, D und G) bei (c) d16 mit $n=20$). Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen nach 9 Tagen (hellgrau) und nach 16 Tagen (dunkelgrau) Kultivierung unter Stimulation mit M-CSF und RANKL.

werte bei geringem pH-Wert des Mediums M(0,5) zu verzeichnen (siehe Abb. 4.13 (b)).

Für Zellen, die auf Polystyrol kultiviert wurden, wurden bei verschiedenen pH-Werten vergleichbare TRAP-Aktivitäten detektiert (siehe Abb. 4.13 (c)). Auf mineralisiertem Kollagentape hingegen ließen sich mit sinkendem pH-Wert tendenziell höhere TRAP-Aktivitäten nachweisen (siehe Abb. 4.13 (d)).

Die Abbildungen 4.13 (e) und (f) zeigt die Messergebnisse der CAII-Aktivität der Spender. Auf Polystyrolproben zeigten sich, pH-Wert-unabhängig, ähnliche Messwerte. Die Bestimmung der CAII-Aktivitäten der Osteoklasten auf mineralisierten Kollagentapes ergaben vergleichbare Werte. Der pH-Wert schien daher keinen Einfluss auf die osteoklastäre Aktivität der Carboanhydrase II zu haben.

Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass bei allen Messungen deutliche interindividuelle Unterschiede der Spender hinsichtlich der Messwerte nachweisbar waren, welche in entsprechenden Darstellungen im Anhang nachvollzogen werden können (siehe Abb. D.1, D.2 und D.3 in D). In den bisher gezeigten Untersuchungen wurde die TRAP-Aktivität der Osteoklasten ausschließlich in Zelllysaten ermittelt. Da das Enzym während der Resorption teilweise auch sekretiert wird, sollte die in den Lysaten gemessene Aktivität mit der TRAP-Aktivität in den Zellkulturüberständen verglichen werden.

In Abbildung 4.14 werden die Messergebnisse für die TRAP-Aktivitäten in den Überständen der Zellkulturproben im Vergleich zur TRAP-Aktivitäten der Zelllysate dargestellt. Bei den hier dargestellten Daten handelt es sich allerdings um die Messwerte eines Einzelspenders. Die Messung von TRAP-Aktivität in den Überständen von Zellkulturproben wurde bereits von verschiedenen Gruppen durchgeführt und wird als Möglichkeit zur Evaluation osteoklastärer Resorptionsaktivität genutzt (Scheven et al., 1997; Karsdal et al., 2003; Kirstein et al., 2006; Fuller et al., 2010). Bei der Messung der TRAP-Aktivität in den Überständen der Proben konnten bei Polystyrolproben etwa zehnmal geringere Werte gemessen werden, als bei den Zelllysaten. Bei den Proben des mineralisierten Kollagentapes ergaben sich sogar etwa zwanzig mal höhere Werte für die TRAP-Aktivitäten, die im Zelllysate gemessen wurden, verglichen zu den in den Überständen nachweisbaren Aktivitäten. Bei der Messung der TRAP-Aktivitäten in den Überständen der Polystyrolproben ergaben sich für den Zeitpunkt d9 signifikant geringere Messwerte der Proben mit M(0,5) im Vergleich zu den ermittelten Daten der Proben mit Standardmedium, M(2,2) sowie M(1,0). Zum Zeitpunkt d16 hingegen ergaben sich signifikant höhere TRAP-Aktivitäten in den Überständen der Proben mit M(0,5) und M(1,0) im Vergleich zu den Proben mit Standardmedium und M(2,2) (siehe 4.14 (a)). Bei der vergleichenden Betrachtung der pH-Wert-abhängigen Entwicklung der TRAP-Aktivitäten, die in den Zelllysaten gemessen wurden (siehe Abb. 4.14 (b)), konnte ein ähnlicher Trend verzeichnet werden.

Die TRAP-Aktivitäten in den Zellkulturüberständen der besiedelten mineralisierten Kollagentapes zeigten sowohl zum Zeitpunkt d9 als auch d16 signifikant höhere Messwerte der Proben mit M(0,5) im Vergleich zu Proben aller anderen pH-Werte (siehe Abb. 4.14 (c)).

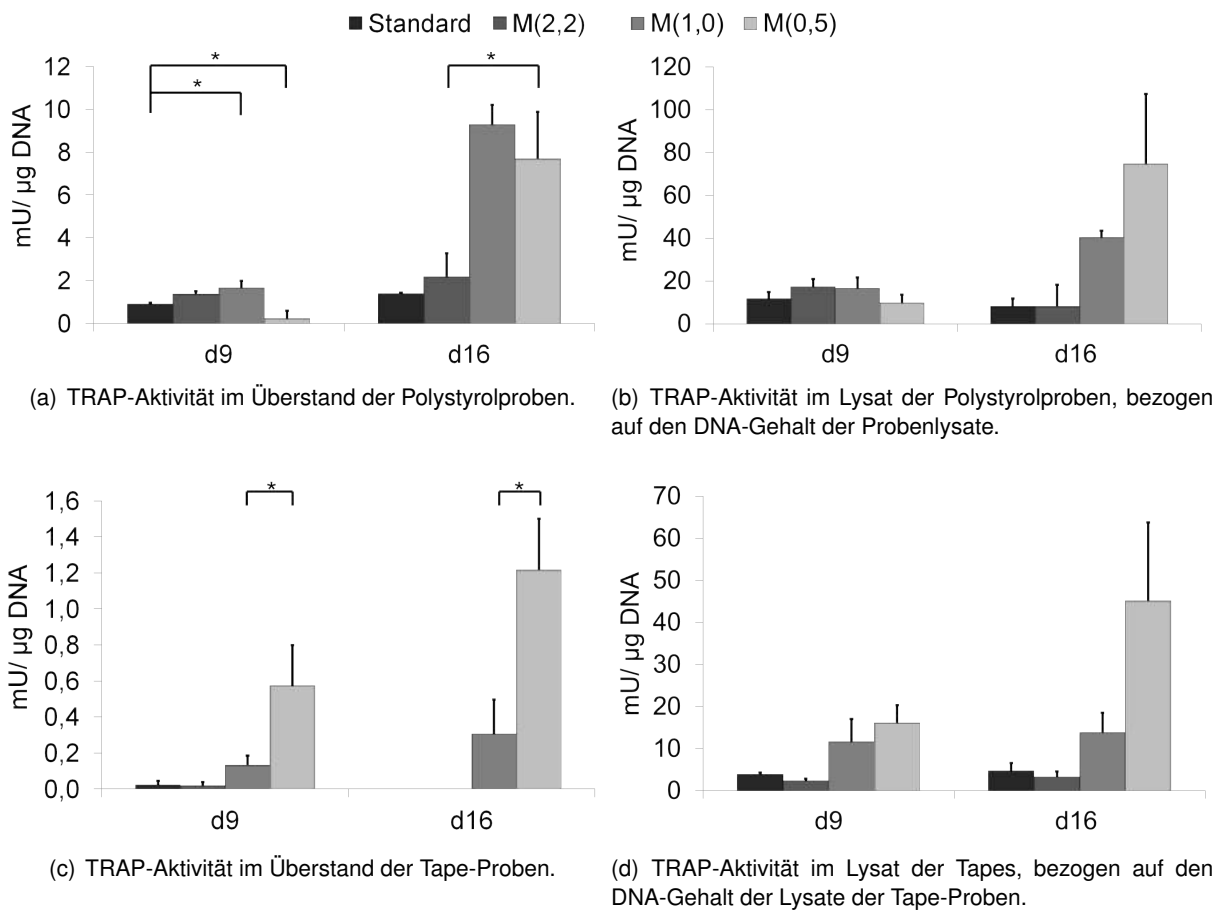


Abbildung 4.14.: Osteoklastogenese von PBMC (Spender F). TRAP-Aktivitäten der Lysate mit n=5 und der Überstände mit n=5 nach 9 und nach 16 Tagen Kultivierung unter Zusatz von M-CSF und RANKL. Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen, *p<0,05. Für den Zeitpunkt d16 der TRAP-Aktivität im Überstand der Tapes liegen keine Werte vor.

Verschiedene Versuche konnten zeigen, dass die *in vivo* Serumkonzentration von TRAP mit der Knochenresorption korreliert (Štěpán et al., 1989; Halleen et al., 2002). Kirstein et al. zeigten in *in vitro* Experimenten, dass die Sekretion von TRAP in das Zellkulturmedium von auf Knochenscheiben kultivierten Osteoklasten signifikant mit dem Ausmaß der Knochenresorption korrelierte (Kirstein et al., 2006). Die Menge des Enzyms konnte nicht durch Zelltod erklärt werden, was für eine aktive Abgabe durch die Osteoklasten spricht. Zudem konnte die TRAP-Abgabe in das Kulturmedium durch Brefeldin A, einem Sekretionsinhibitor, reduziert werden. Dies deutete darauf hin, dass die TRAP-Abgabe in das Zellkulturmedium als Marker für die resorptive Aktivität der Osteoklasten genutzt werden kann, da die steigende Freisetzung des Enzyms mit einem starken Anstieg des Knochenabbaus verbunden war. Kirstein et al. zeigten weiterhin, dass mit steigender Abgabe von TRAP in den Überstand der Zellkulturen die nachweisbare TRAP-Aktivität der Zelllysate sank (Kirstein et al., 2006). Die Aktivität von TRAP, speziell der Isoform TRAP 5b, wird seit langem als spezifischer Marker für osteoklastäre Resorption verwendet (Štěpán et al., 1989; Halleen et al., 2000; Janckila et al., 2001). Es ist weiterhin bekannt, dass Osteoklasten *in vitro* die TRAP während des Resorptionsprozesses sekretieren (Miller, 1985). Bei Individuen, die ein hohes Maß an Knochenresorption aufweisen, können erhöhte TRAP-Werte im Serum nachgewiesen werden (Štěpán et al., 1989; Halleen et al., 2002). Zudem stimulierten Substanzen, die die Knochenresorption anregen, auch die TRAP-Freisetzung. Ergebnisse von Štěpán et al. lassen ebenfalls annehmen, dass die Freisetzung von TRAP mit der Resorptionsaktivität von Osteoklasten korreliert (Štěpán et al., 1989). Kirstein et al. zeigten, dass auf unterschiedlichen Materialien inkubierte, vollständig differenzierte und zur Resorption fähige Osteoklasten nur dann eine Sekretion des Enzyms TRAP zeigten, wenn die Zellen auf resorbierbaren Materialien, wie beispielsweise Knochen, inkubiert wurden. Die Inkubation auf Plastik- oder Glasoberflächen hingegen führte nicht zur Sekretion des Enzyms (Kirstein et al., 2006). Die Ergebnisse von Kirstein et al. stimmen ebenfalls mit früheren Daten überein, die zeigten, dass mineralisierte, aber keine plastikartigen Substrate den Protonentransport in Osteoklasten induzierten (Zimolo et al., 1995) und dass resorbierende Osteoklasten eine gesteigerte Protonensekretion aufwiesen (Lees et al., 2001).

Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen wird in der Literatur vielfach die Ausbildung TRAP-positiver multinuklearer Osteoklasten auch auf nicht-resorbierbarem Zellkulturpolystyrol beschrieben. Alatalo und Mitarbeiter zeigten sogar eine Korrelation zwischen der Anzahl mehrkerniger Osteoklasten auf Polystyrol und der TRAP-Aktivität im Zellkulturüberstand (Alatalo et al., 2000). Dabei wurden Osteoklasten verwendet, die aus murinem Knochenmark differenziert wurden. Bereits 1989 stellten Hattersley und Chambers fest, dass die TRAP Aktivität *in vitro* ein unzuverlässiger Marker für die osteoklastäre Differenzierung ist. Zudem ist die Messung der TRAP als Marker für die osteoklastäre Knochenresorption etabliert (Minkin, 1982; Halleen et al., 2000; Nakanishi et al., 2000). Das Enzym wird wahrscheinlich nach der Bildung durch die Zelle transportiert und gemeinsam mit Knochenmatrixfragmenten durch den FSD sekretiert (Halleen et al., 1999). Dies führt zu der Annahme, dass die von den Osteoklasten freigesetzte Menge an TRAP mit den freigesetzten organischen Knochenmatrixabbauprodukten korreliert, wie beispielsweise mit Kollagenfragmenten. In der Tat haben Scheven et al. gezeigt, dass die Freisetzung von Kollagenfragmenten, in Zusammenhang mit dem Knochenabbau, signifikant mit der TRAP-Sekretion der Osteoklasten während des Resorptionsprozesses korreliert (Scheven et al., 1997). Somit wird die Rolle der TRAP als Resorptionsmarker unterstützt. Allerdings wurde die TRAP-Aktivität von Scheven et al. bei einem pH-Wert von 5,0 gemessen (Scheven et al., 1997), weshalb bei den durchgeführten Messungen die Gesamt-TRAP-Aktivität erfasst wur-

de, und nicht die Aktivität der für Osteoklasten spezifischen Isoform 5b. Diese Isoform wurde von Halleen et al. als ein nützlicher Parameter für die Beobachtung antiresorptiver Therapien beschrieben (Halleen et al., 2000). Bei den von Halleen et al. durchgeführten Versuchen stellte sich heraus, dass die im Serum gemessene Aktivität der TRAP 5b bei Patienten mit Osteoporose signifikant erhöht war und eine signifikant negative Korrelation mit der Knochendichte aufwies. Diese Ergebnisse zeigten einen Zusammenhang zwischen der Menge an detektierbarer TRAP 5b und der Knochenresorptionsrate (Halleen et al., 2002). Die Gruppe Alatalo et al. konnte zeigen, dass in Zellkulturen aus murinem Knochenmark sowohl die Anzahl der gebildeten Osteoklasten, als auch die im Medium detektierbare TRAP 5b-Aktivität mit fortschreitender Kultivierungsdauer signifikant anstiegen. Dabei korrelierte die Bildung von Osteoklasten signifikant mit der Menge an TRAP 5b, die ins Kulturmedium abgegeben wurde (Alatalo et al., 2000). Die Daten von Alatalo et al. deuten jedoch darauf hin, dass reife Osteoklasten TRAP 5b grundsätzlich ins Kulturmedium sekretieren. Es ist anzunehmen, dass die Menge an TRAP 5b, die in die Zirkulation freigesetzt wird, eher die Anzahl reifer Osteoklasten anzeigt, als, wie beispielsweise von Halleen et al. beschrieben, deren Resorptionsaktivität (Alatalo et al., 2000). Dies ist in Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit erhobenen Daten zu bringen, bei denen auch die Kultivierung von Osteoklasten auf nicht resorbierbarer Polystyroloberfläche zur Sekretion von TRAP geführt hat. Karsdal et al. zeigten ebenfalls, dass die TRAP von Osteoklasten unabhängig davon freigesetzt wurde, auf welchem Material die Zellen kultiviert wurden (Karsdal et al., 2003). Die TRAP wurde nachweislich bereits dann freigesetzt, wenn sich die Osteoklasten noch in einem frühen Differenzierungsstadium befanden. Dies zeigt ebenfalls, dass die Sekretion des Enzyms nicht zwingend mit der Resorptionsaktivität assoziiert ist, da scheinbar auch nicht resorbierende Osteoklasten TRAP bildeten und sekretierten (Karsdal et al., 2003). Die histochemische Anfärbung der TRAP in Osteoklasten, die auf Polystyrol kultiviert wurden, zeigte ebenfalls, dass auch nicht resorbierende Osteoklasten das Enzym in großen Mengen exprimierten (siehe Abb. 4.15 (d) und Karsdal et al., 2003). Zudem konnte gezeigt werden, dass die TRAP auch in mononuklearen, spindelförmigen Zellen nachweisbar war (siehe Abb. 4.15 (a)). Das Enzym scheint also generell von den Monozyten unter den hier eingesetzten Kultivierungsbedingungen gebildet zu werden, unabhängig von ihrer resorptiven Aktivität. Die Gruppe Hattersley et al. hat die Anzahl mehrkerniger Zellen, TRAP-Aktivität und Knochenresorption in Kulturen muriner Knochenmarkzellen bestimmt. Ihre Ergebnisse zeigten, dass Mehrkernigkeit und TRAP-Aktivität nicht mit der Differenzierung knochenresorbierender Zellen in *in vitro* Kulturen korrelierten. Die Gruppe schlussfolgerte, dass Mehrkernigkeit und die Höhe der TRAP-Aktivität *in vitro* unsichere Marker für einen osteoklastären Phänotyp darstellen (Hattersley und Chambers, 1989). Auch in den hier durchgeführten Untersuchungen wurde in Überständen und Lysaten von auf Polystyrol kultivierten Osteoklasten TRAP-Aktivität nachgewiesen. Die von Kirstein et al. beschriebene Abnahme von gemessener TRAP-Aktivität der Zelllysate, bei zeitgleichem Anstieg der messbaren Aktivitäten im Zellkulturüberstand, konnte in den Experimenten nicht beobachtet werden. Generell konnten in den Zellkulturüberständen nur geringe Aktivitäten der TRAP nachgewiesen werden. Zudem waren die Aktivitäten der TRAP in Überständen von Osteoklasten, die auf mineralisierten Kollagentapes kultiviert wurden, noch geringer, als die Aktivitäten, die in den Überständen der auf Polystyrol kultivierten Osteoklasten gemessen werden konnten. Kirstein et al. verwendeten in ihrem Versuch allerdings murine Osteoklasten, die sich zunächst auf Zellkulturpolystyrol aus Vorläuferzellen differenzierten und dann auf verschiedene Substrate umgesetzt wurden. In den Experimenten dieser Arbeit wurden hingegen humane Monozyten eingesetzt, die zudem direkt auf den

entsprechenden Materialien zur osteoklastären Differenzierung angeregt und kultiviert wurden. Dies könnte möglicherweise eine Ursache für die unterschiedlichen Beobachtungen sein.

Histochemische Anfärbung der TRAP

Abbildung 4.15 zeigt die histochemische Anfärbung der TRAP-Aktivität in Zellen auf Polystyrolproben, die unter Einfluss unterschiedlichen pH-Medien kultiviert wurden. Auffallend ist, dass sich der Großteil der Zellen, die M(0,5) erhielten, nicht zu Osteoklasten differenzierten. Die meisten Zellen dieser Proben waren einkernig und wiesen eine bipolare, spindelförmige Morphologie auf. Dennoch konnte in ihren Zellkörpern ein hoher TRAP-Gehalt mittels histochemischer Anfärbung nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.15 (a)). Mit steigendem pH-Wert ließ sich eine steigende Anzahl differenzierter, mehrkerniger Osteoklasten mit größeren Zellkörpern beobachten, welche ebenfalls hohe TRAP-Mengen in ihren Zellkörpern aufwiesen. Unter dem Einfluss von Standardmedium zeigte sich die geringste Anzahl mononuklearer, bipolarer Zellen.

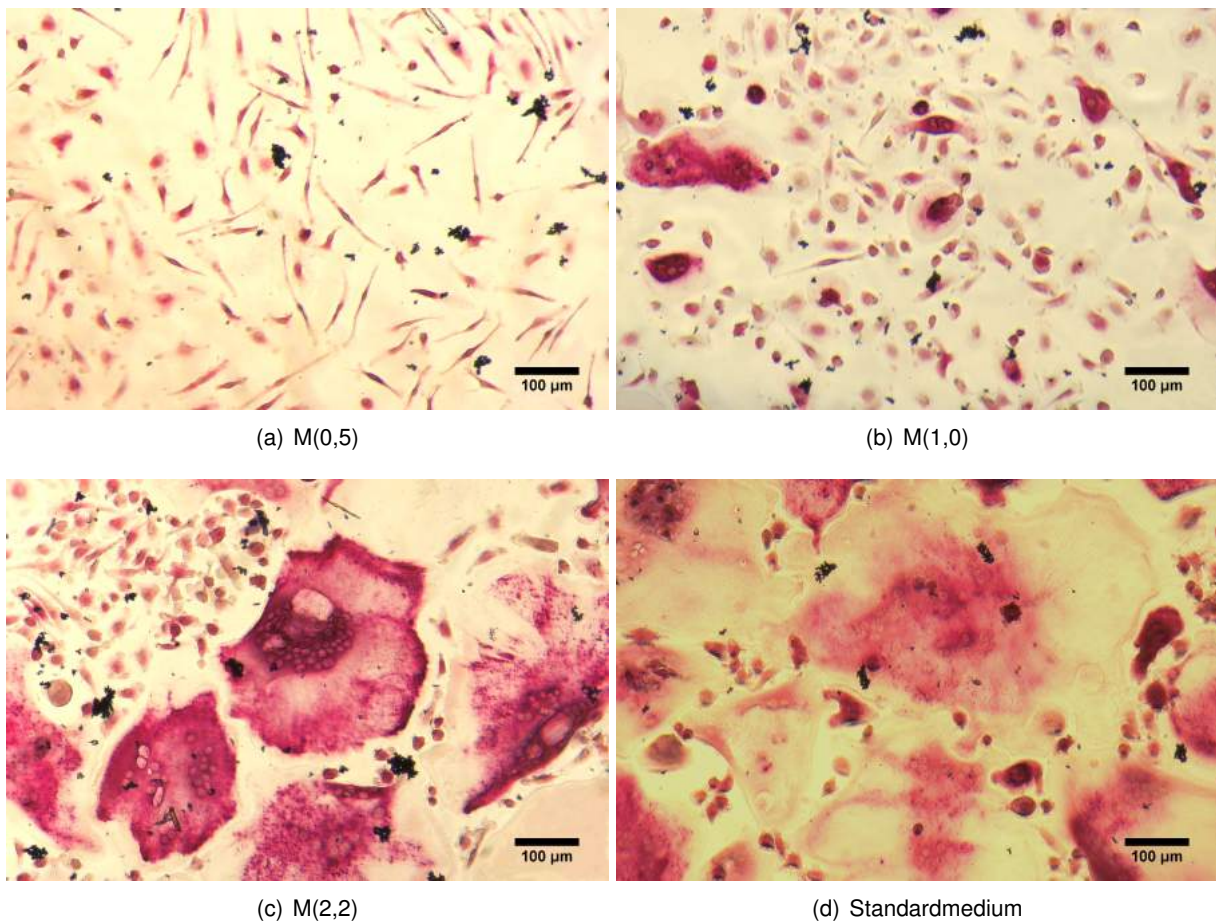


Abbildung 4.15.: TRAP-Färbung von osteoklastären Zellen nach 16 Tagen Kultivierung auf Polystyrol unter Stimulation mit M-CSF und RANKL sowie bei verschiedenen pH-Werten.

Die Gruppe Glenske et al. färbte ebenfalls mittels histochemischer TRAP-Färbung große und kleinere Osteoklasten, sowie spindelförmigen Zellen an. Dabei wurde gezeigt, dass die TRAP auch bei mononuklearen Zellen in hohen Mengen nachweisbar war, und dass ebenfalls die spindelförmigen Zellen eine hohe TRAP-Aktivität aufwiesen (Glenske et al., 2014). In dem durchgeführten Experiment konnte mittels Fluoreszenzmessung der Zelllysate die höchste TRAP-Aktivität bei den Proben nachgewiesen werden, die unter Einfluss des geringsten pH-Wertes (M(0,5)) standen. Mikroskopisch konnte jedoch gezeigt werden, dass sich unter dem Einfluss dieses pH-Wertes keine Osteoklasten bildeten, sondern mononukleare Zellen mit einer bipolaren, spindelförmigen Morphologie. Es bildeten sich unter diesen pH-Bedingungen kaum mehrkernige Osteoklasten aus (siehe dazu Abb.4.15 (a)). Diese Beobachtungen stimmen mit denen der Gruppe Glenske et al. überein. Der alleinige Nachweis von TRAP-Aktivität demzufolge nicht ausreichend, um auf das Vorhandensein von Osteoklasten zu schließen. Abbildung 4.16 zeigt Fluoreszenzaufnahmen der besiedelten Tapes unter Einfluss der verschiedenen pH-Medien nach einer Kultivierungsdauer von 16 Tagen. Auch hier zeigten sich bei Kultivierung mit M(0,5) vorwiegend mononukleare Zellen.

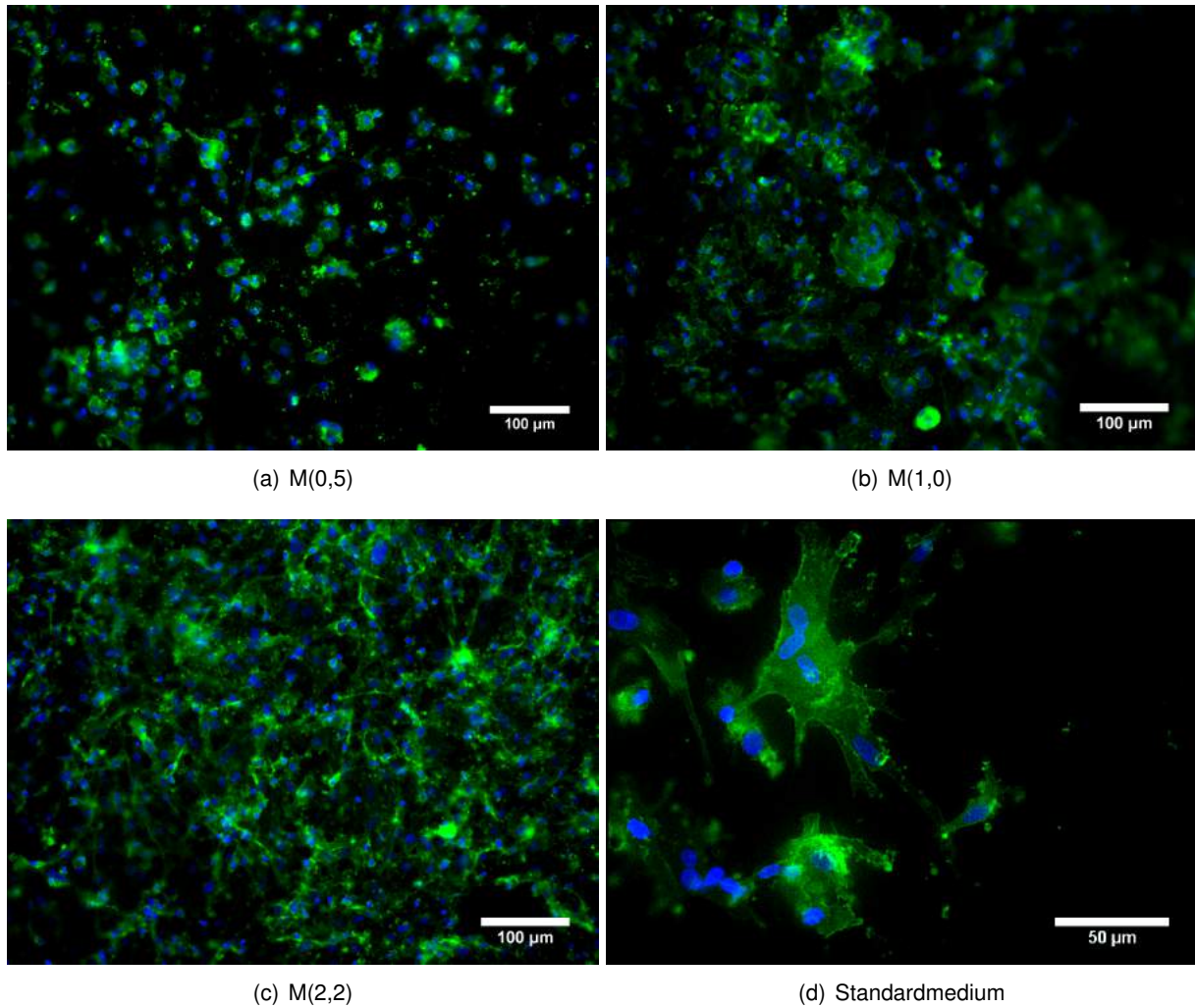


Abbildung 4.16.: Osteoklasten auf membranähnlichen mineralisierten Kollagentapes nach 16 Tagen Kultivierung unter Zusatz von M-CSF und RANKL sowie bei verschiedenen pH-Werten.

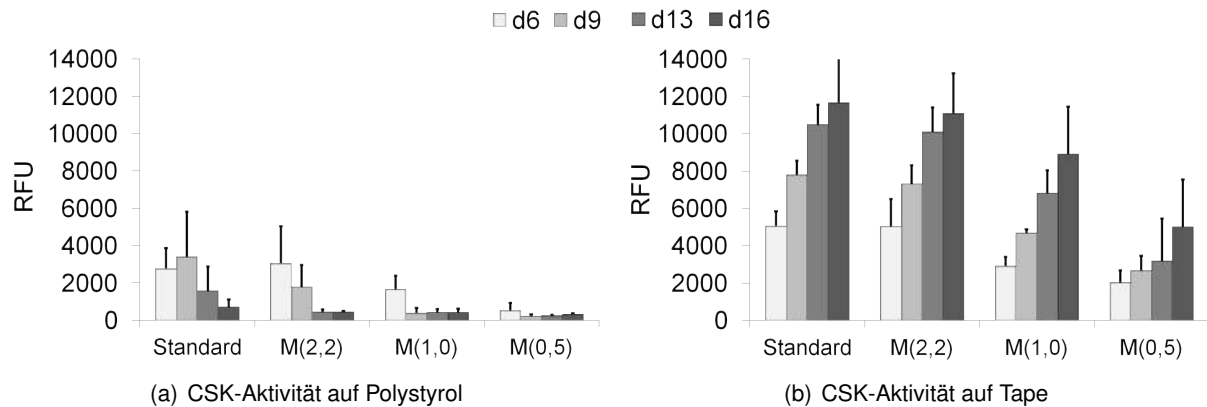


Abbildung 4.17.: Kathepsin K-Aktivität von Osteoklasten der Spender A, B und D (je $n_x=5$) mit $n=15$ auf Polystyrol (a) und Tape (b). Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen.

Einfluss des pH-Wertes auf die Kathepsin K-Aktivität der Osteoklasten

Die Daten zur Kathepsin K-Aktivität wurden jeweils von drei verschiedenen Spendern zu den Zeitpunkten d6, d9, d13 und d16 ermittelt. In Abb. 4.17 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Messergebnisse aller drei Spender zu den entsprechenden Zeitpunkten dargestellt. Auffallend ist, dass sich auf Polystyrol wesentlich geringere Messwerte ergaben, als auf mineralisiertem Kollagentape. Zudem nimmt die CSK-Aktivität der Osteoklasten auf Tape im Zeitverlauf von d6 bis d16 der Kultivierung kontinuierlich zu, auf Polystyrol nimmt sie hingegen ab. Dies weist auf eine mögliche Korrelation der Enzymaktivität in den Überständen der Kulturen mit der Resorptionsaktivität der Osteoklasten hin. Auf Polystyrol können die Osteoklasten kein Material resorbieren, entsprechend gering sind die ermittelten CSK-Aktivitäten, hingegen ist die Resorption auf mineralisiertem Kollagentape möglich, was sich in höheren Messwerten der Enzymaktivität widerspiegelt. Die steigende Aktivität im Zeitverlauf war ebenfalls bei der CAII-Aktivität der Zelllysate von auf Tape kultivierten Osteoklasten zu verzeichnen. Ein Aktivitätsanstieg der Enzyme mit fortschreitender Kultivierungszeit kann mit der Ausdifferenzierung der Monozyten zu reifen Osteoklasten erklärt werden. Ein steigender Differenzierungsgrad spricht für eine steigende Resorptionsaktivität, denn nur ein ausdifferenzierter Osteoklast ist zur Resorption fähig. Die Gruppe Sun et al. beschrieb ebenfalls, dass mit steigendem Differenzierungsgrad der Osteoklasten eine ausgeprägte Sekretion von aktivem Kathepsin K festgestellt werden konnte, jedoch nicht bei Makrophagenkulturen (Sun et al., 2013). Kathepsin K schneidet Kollagen in Fragmente und die Carboanhydrase II sorgt für die Produktion der für die Resorption notwendigen Protonen. Somit spielen beide Enzyme eine wichtige Rolle im osteoklastären Prozess des Knochenabbaus. Auch beim Spendervergleich auf Polystyrol (siehe Abb. 4.8) stiegen die CAII-Aktivitäten bei allen Spendern vom Zeitpunkt d9 zu d16 an, die TRAP-Aktivitäten jedoch nicht.

Im Gegensatz dazu konnte bei der Messung der TRAP-Aktivitäten festgestellt werden, dass dieses Enzym in größeren Mengen auch in spindelförmigen Zellen nachweisbar war, welche noch nicht zu ausgereiften Osteoklasten differenziert waren (Glenske et al., 2014).

Der Einfluss des pH-Wertes auf die Entwicklung und Aktivität von Osteoklasten wurde bereits von verschiedenen Gruppen untersucht. Mit sinkendem pH-Wert konnte in mehreren Versuchen eine ge-

steigerte osteoklastäre Resorptionsaktivität nachgewiesen werden (Carano et al., 1993; Murrills et al., 1993; Arnett und Dempster, 1986; Goldhaber und Rabadjija, 1987; Teti et al., 1989; Biskobing und Fan, 2000). Zudem zeigte sich ein Trend zu einer gesteigerten CAll-Genexpression bei sinkendem pH-Wert. Dies deutet darauf hin, dass eine gesteigerte Expression osteoklastärer Enzyme, die in den Resorptionsprozess involviert sind, vermutlich der Mechanismus für die verstärkte Resorptionsaktivität bei geringerem pH-Milieu sein könnte (Biskobing und Fan, 2000). Bekannt ist auch, dass eine metabolische Azidose nachweislich zu einem gesteigerten Knochenabbau führt (Arnett und Dempster, 1990). Ein geringer pH-Wert stimuliert zudem die Formation von Podosomen (Teti et al., 1989) sowie die Bildung einer höheren Anzahl Resorptionslakunen mit einer größeren resorbierten Fläche (Arnett und Dempster, 1986; Murrills et al., 1993; Shibutani und Heersche, 1993). Es konnte ebenfalls eine signifikant höhere Anzahl ausgebildeter *clear zones* bei Osteoklasten nachgewiesen werden, die sich in der anfänglichen Phase starker Resorptionsaktivität befanden (Murrills et al., 1993). Verschiedene Gruppen zeigten jedoch auch, dass die Anzahl an Osteoklasten bei geringerem pH-Wert für den Zeitraum von 24-72 h konstant blieb, beziehungsweise leicht absank (Arnett und Dempster, 1986; Carano et al., 1993; Murrills et al., 1993).

Die ermittelten Messdaten weisen darauf hin, dass die Aktivitätsmessung der TRAP als Marker für die osteoklastäre Resorption kritisch zu betrachten ist. Die histochemische Anfärbung zeigte, dass das Enzym in jedem Fall von den Zellen exprimiert wird, die unter Zusatz von M-CSF und RANKL zur osteoklastären Differenzierung angeregt wurden, unabhängig davon, ob sich tatsächlich reife Osteoklasten bildeten. Die TRAP-Aktivitäten, die in den Überständen der Kulturen ermittelt wurden, waren auf Polystyrolproben höher als auf dem potentiell resorbierbaren mineralisierten Kollagentape. Die Zellysate wiesen signifikant höhere TRAP-Aktivitäten auf, als die Überstände, jedoch waren auch hier bei den Proben auf Polystyrol höhere Werte zu verzeichnen, als auf Tape. Da auf Polystyrol keine Resorption stattfinden kann, ist die Messung der TRAP im Allgemeinen als Marker für die osteoklastäre Resorptionsaktivität ungeeignet.

Die Kathepsin K-Aktivität in den Zellkulturüberständen verschiedener Spender in den durchgeführten Experimenten schien hingegen mit der Resorptionsaktivität der Osteoklasten zu korrelieren. Auf nicht resorbierbarem Material konnte kaum Aktivität des Enzyms nachgewiesen werden, zudem sanken diese geringen Werte im Zeitverlauf weiter ab und näherten sich dem Nullpunkt. Auf resorbierbaren Materialien hingegen konnten hohe Kathepsin K-Aktivitäten nachgewiesen werden, die im Zeitverlauf zudem weiter anstiegen. Die Aktivität der Carboanhydrase II zeigte eine ähnliche zeitliche Entwicklung. Diese Ergebnisse deuten auf eine positive Korrelation der Aktivitäten beider Enzyme mit der Resorptionsaktivität der Osteoklasten hin.

Kathepsin K ist ein entscheidendes Enzym im Prozess der osteoklastären Knochenresorption (Gelb et al., 1996; Littlewood-Evans et al., 1997; Garnerio et al., 1998; Saftig et al., 1998; Gowen et al., 1999; Delaissé et al., 2003). Verglichen mit anderen Zellen zeigen Osteoklasten eine hohe Expression von Kathepsin K, wohingegen andere Kathepsinformen, wie beispielsweise Kathepsin L und S, von ihnen in viel geringeren Mengen exprimiert werden (Drake et al., 1996; Delaissé et al., 2003). Wird Kathepsin K in Mäusen überexprimiert, kann ein beschleunigter Knochenabbau nachgewiesen werden (Kiviranta et al., 2001; Delaissé et al., 2003). Auch bei Frauen mit postmenopausaler Osteoporose und bei Patienten mit *Pagets Disease* konnten stark erhöhte mittleren Serum-Kathepsin K-Werte nachgewiesen werden (Delaissé et al., 2003; Meier et al., 2005). Bei der Untersuchung von Kathepsin K-*Knockout*-Mäusen zeigte sich ein osteopetrotischer Phänotyp der Röhrenknochen, was

auf ein Defizit in der Knochenresorption zurückzuführen ist (Saftig et al., 1998; Gowen et al., 1999; Delaissé et al., 2003). Bei solchen *Knockout*-Mäusen fand sich zudem eine Akkumulation von demineralisierten Kollagenfibrillen in subosteoklastären Resorptionszonen (Saftig et al., 1998; Gowen et al., 1999; Delaissé et al., 2003). Bei Patienten mit einer genetischen Mutation des Kathepsin K-Gens, welche in dem Krankheitsbild der Pycnodysostose resultiert, liegt ebenfalls ein Defizit in der Knochenresorption vor (Gelb et al., 1996; Gowen et al., 1999; Delaissé et al., 2003). Durch die selektive Hemmung von Kathepsin K in Tiermodellen zur Untersuchung der Osteoporose konnte eine Reduktion des Knochenabbaus erreicht werden (Votta et al., 1997; Stroup et al., 2001; Lark et al., 2002; Delaissé et al., 2003). Die Serumkonzentration von Kathepsin K scheint also die osteoklastäre Aktivität widerzuspiegeln und sich somit als potentieller Marker für die Evaluation der Osteoklastenaktivität zu eignen (Meier et al., 2005). Andere Gruppen, die die Expression von Kathepsin K durch Genanalyse untersuchten, konnten mit ihren Messungen zeigen, dass das Enzym auch von Osteoklasten exprimiert wird, die auf Plastik kultiviert wurden. Demnach wird es von den Zellen auch auf nicht resorbierbaren Oberflächen gebildet (Karsdal et al., 2003; Henriksen et al., 2004).

In den durchgeführten Experimenten wurde die Kathepsin K-Aktivität in den Überständen der Proben mit Hilfe eines spezifischen Substrates für Kathepsin K photometrisch bestimmt. Die ermittelten Aktivitäten waren auf resorbierbaren Oberflächen höher als auf Polystyrol. Zudem stiegen die auf mineralisiertem Tape gemessenen Werte mit steigender Kultivierungszeit weiter an. Beides deutet auf eine Korrelation zwischen der Enzymaktivität und der Resorptionsaktivität der Osteoklasten hin. Der Anstieg der messbaren Enzymaktivität im zeitlichen Verlauf ist ein Hinweis auf die fortschreitende Ausdifferenzierung der Monozyten zu reifen Osteoklasten (Sun et al., 2013).

4.9. Einfluss des Kultivierungsmediums auf die Osteoklastogenese

Die Zugabe von Serum in das Zellkulturmedium wird verbreitet als primärer Nährstoffzusatz für Zellkulturen genutzt. Dadurch werden Hormone, mitogene Peptide, Wachstumsfaktoren, Zelladhärenzproteine, essenzielle Fettsäuren und viele andere wichtige Stoffe für das Überleben und das Wachstum der Zellen bereitgestellt. Fetales Kälberserum (FCS) sowie Humanserum AB (HS) zeigten in früheren Experimenten gute Ergebnisse bei der Kultivierung von Monozyten. Welchen Einfluss die Zugabe von Serum in das Medium auf die Adhärenz und die Reinheit der Monozytenkultur hat, ist noch immer nicht vollständig geklärt (Bennett und Breit, 1994).

Wachstumsfaktoren im Serum könnten beispielsweise das Überleben von Lymphozyten unterstützen, die die Monozytenzellkultur verunreinigen. Die Gruppe Koller et al. konnte zeigen, dass ohne die Anwesenheit von Serum im Medium Lymphozyten besser an Glas adhärten und somit die Reinheit der Monozytenkulturen vermindert war. Proben, die ohne Serum im Medium inkubiert wurden, wiesen einen hohen prozentualen Anteil adhärenter Lymphozyten auf. Proben, die hingegen mit Serum im Medium inkubiert wurden, enthielten eine hohe Reinheit an Monozyten (95 %) und unter 5 % Lymphozyten. Die Anwesenheit von Serum im Medium modifiziert die Oberfläche scheinbar derart, dass Lymphozyten schlechter adhärten können (Koller et al., 1973).

Für die *in vitro* Osteoklastogenese finden sich in der Literatur verschiedene Angaben zur Zusammensetzung des Zellkulturmediums. Eine Übersicht der von verschiedenen Gruppen verwendeten Kulturmedien gibt Tabelle 4.4. Es gibt dabei Unterschiede in der Anwendung von Alpha-Medium (α MED) oder *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) und der Zugabe von Humanserum (HS), aktivem FCS (aFCS) und hitzeinaktiviertem FCS (hiFCS). Die Ergebnisse verschiedener Gruppen zeigen allgemein, dass sich die Anwesenheit von aktivem Serum im Kulturmedium positiv auf die Adhärenz und die Reinheit der Monozytenkultur, sowie auf das Überleben der Zellen auswirkt (Koller et al., 1973; Kumaratilake und Ferrante, 1988; Bennett und Breit, 1994). Der Einsatz hitzeinaktivierten Serums hingegen scheint eine negative Wirkung zu haben (Johnson Jr et al., 1977). In Tabelle 3.2 in Abschnitt 3 ist die Zusammensetzung verschiedener Basalmedien für die Osteoklastogenese humaner PBMC zusammengestellt.

In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits ein Vergleichsexperiment mit Medien, die unterschiedliche Arten und Mengen von Seren enthielten, durchgeführt. Die Daten dieses Experiments wurden nicht veröffentlicht. In dem genannten Versuch wurde Zellkulturpolystyrol mit Monozyten besiedelt und diese zur osteoklastären Differenzierung angeregt. Dabei wurde als Basalmedium Alphamedium mit 10 % HS, 10 % FCS oder 5 % HS/5 % FCS verwendet. Proben, die 10 % HS-Medium erhielten, wiesen die höchsten CAII-Aktivitäten auf. Danach folgten Proben mit der FCS/HS Kombination und die geringsten Werte wurden bei Proben mit 10%igem FCS-Medium gemessen. Auch der gemessene DNA-Gehalt war bei Proben, die Medium mit 10% HS erhielten, am höchsten. Die höchste TRAP-Aktivität wurde hingegen beim Kombinationsmedium mit FCS/HS erreicht, sie war mehr als doppelt so hoch als bei Medium mit reinem HS.

Die Gruppe Kreja et al. testete vier verschiedene FCS-Chargen für den Einsatz im Kultivierungsmedium für osteoklastäre Differenzierung. Nur eine der vier getesteten Chargen unterstützte die Bildung von Osteoklasten. Somit scheint die Serumcharge, möglicherweise durch eine Variation enthaltener Serumproteine, ebenfalls einen Einfluss auf die Differenzierung von Vorläuferzellen zu reifen Osteoklasten zu haben (Kreja et al., 2007). Im Rahmen dieser Arbeit wurden ebenfalls Versuche zur Un-

Tabelle 4.4.: Zusammensetzung der Basalmedien für die Osteoklastogenese humaner PBMC

Zusatz	Prozent in Medium	Quelle
FCS	10 % in α MEM	Glenske et al., 2014 Sun et al., 2013 Cantley et al., 2013 Kreja et al., 2007 Chen et al., 2007 Schilling et al., 2004 Susa et al., 2004
	10 % in DMEM	Boanini et al., 2012 Nakagawa et al., 2004 Nicholson et al., 2000
hiFCS	10 % in α MEM 15 % in α MEM	Lehman et al., 2012 Perotti et al., 2009
HS	20 % in α MEM	Costa-Rodriguez et al., 2012
	30 % in α MEM	Costa-Rodriguez et al., 2011
	10 % in α MEM	Botelho et al., 2006
	10 % in RPMI Medium	Almeida et al., 2000
HS/FCS	7,5 % FCS + 7,5 % HS in α MEM	John et al., 2009 Domaschke et al., 2006

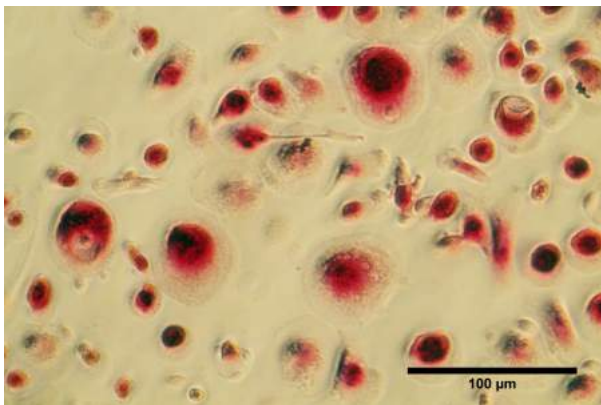
tersuchung des Einflusses der Zusammensetzung des eingesetzten Mediums auf die Osteoklastogenese und die Enzymaktivität der Osteoklasten durchgeführt. Es wurden dabei drei unterschiedliche Medien miteinander verglichen (siehe Tabelle 4.5). Am Tag der Besiedlung (d0) erhielten alle Proben zunächst M(hiFCS). Ab d1 wurde das entsprechend vorgesehene Kultivierungsmedium mit je 25 ng/ml M-CSF eingesetzt, ab d2 zusätzlich mit jeweils 50 ng/ml RANKL. Alle Medien enthielten zudem 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penizillin sowie 100 µg/ml Streptomycin. Es wurden sowohl Polystyrolproben, Membranen aus mineralisiertem Kollagen (Tapes) als auch von Osteoblasten gebildetes mineralisiertes Kollagen (siehe Abschnitt 3 in Chemikalien und Reagenzien) mit Monozyten besiedelt und über 16 Tage kultiviert. Mittels histochemischer Anfärbung der TRAP konnten unter Einfluss aller drei Kultivierungsmedien mehrkernige Osteoklasten auf Polystyrolproben nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.18).

Tabelle 4.5.: Zusammensetzung der getesteten Medien

Name	Zusätze im Alphamedium
M(HS/FCS) (Standardmedium)	5 % HS 5 % hiFCS
M(aFCS)	10 % aktives FCS
M(hiFCS)	10 % hiFCS



(a) M(HS/FCS)



(b) M(aFCS)



(c) M(hiFCS)

Abbildung 4.18.: TRAP-Färbung von Osteoklasten auf Polystyrol, die mit M-CSF und RANKL unter Einfluss verschiedener Medienzusammensetzungen 15 Tage kultiviert wurden.

4.9. Einfluss des Kultivierungsmediums auf die Osteoklastogenese

In Abbildung 4.19 wird der Einfluss des verwendeten Kultivierungsmediums auf den DNA-Gehalt (Abb. 4.19 (a)), sowie die TRAP-, CAII- und Kathepsin K-Aktivitäten (Abb. 4.19 (b), (c) und (d)) von Osteoklasten, kultiviert auf Polystyrol, dargestellt. Der DNA-Gehalt der Proben, die das Standardmedium M(HS/FCS) erhielten, war sowohl zum Zeitpunkt d9 als auch zum Zeitpunkt d16 signifikant höher als der DNA-Gehalt der Proben, die mit M(aFCS) bzw. M(hiFCS) kultiviert wurden. Hinsichtlich der TRAP-Aktivität zeigten die Proben mit M(HS/FCS) an Tag 9 signifikant höhere Werte im Vergleich zu beiden anderen Gruppen. Auch die Aktivität der Carboanhydrase II war bei Zellen, die M(HS/FCS) erhielten, sowohl an Tag 9 als auch an Tag 16 signifikant höher als bei Zellen, die mit M(aFCS) beziehungsweise M(hiFCS) kultiviert wurden. An Tag 16 zeigte sich zudem ein signifikanter Unterschied zwischen der CAII-Aktivität unter M(aFCS) verglichen mit der Kultivierung unter M(hiFCS). Die statistische Auswertung der Kathepsin K-Aktivität ergab eine zu allen Messzeitpunkten signifikant geringere Enzymaktivität der mit M(HS/FCS) kultivierten Proben, verglichen mit den Kathepsin K-Aktivitäten der Proben, die M(hiFCS) erhielten.

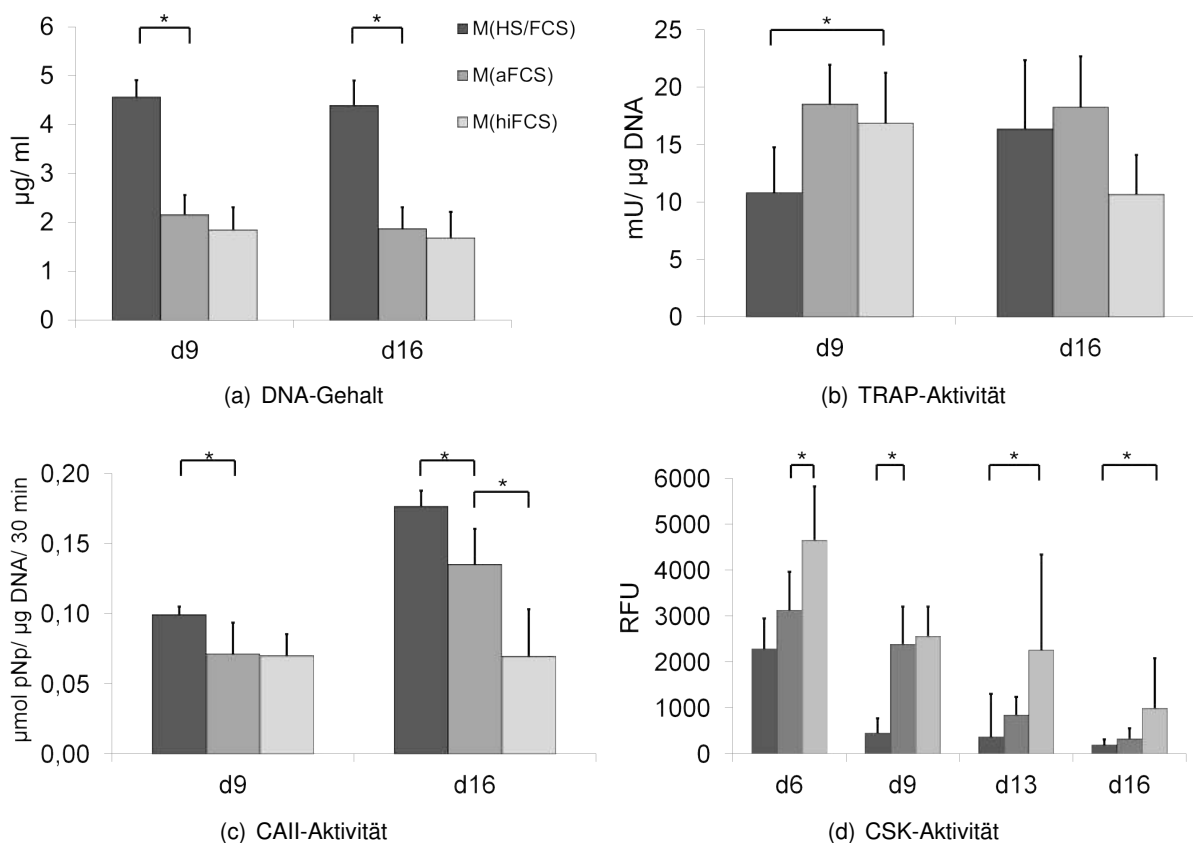


Abbildung 4.19.: DNA-Gehalt (a), TRAP-Aktivität (b), CAII-Aktivität (c) und CSK-Aktivität (d) osteoklastärer Zellen auf Polystyrol zum Zeitpunkt d9 bzw. d16 unter Einfluss verschiedener Medien. Messdaten von Spender I und J (je $n_x=5$) mit $n=10$, Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen, * $p < 0,05$.

Abbildung 4.20 zeigt die Darstellung der Messergebnisse von Osteoklasten sechs verschiedener Spender, die M(HS/FCS) beziehungsweise M(aFCS) als Kultivierungsmedium auf Polystyrol erhielten. Hinsichtlich des DNA-Gehaltes zeigten die Zellen unter M(HS/FCS) sowohl zum Zeitpunkt d9 als auch d16 signifikant höhere Werte als unter M(aFCS). Für die TRAP-Aktivität allerdings ergaben sich zu beiden Messzeitpunkten für die Zellen unter M(aFCS) signifikant höhere Messwerte, als für die Osteoklasten, die unter M(HS/FCS) kultiviert wurden. Es konnten zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede in der Aktivität der Carboanhydrase II nachgewiesen werden.

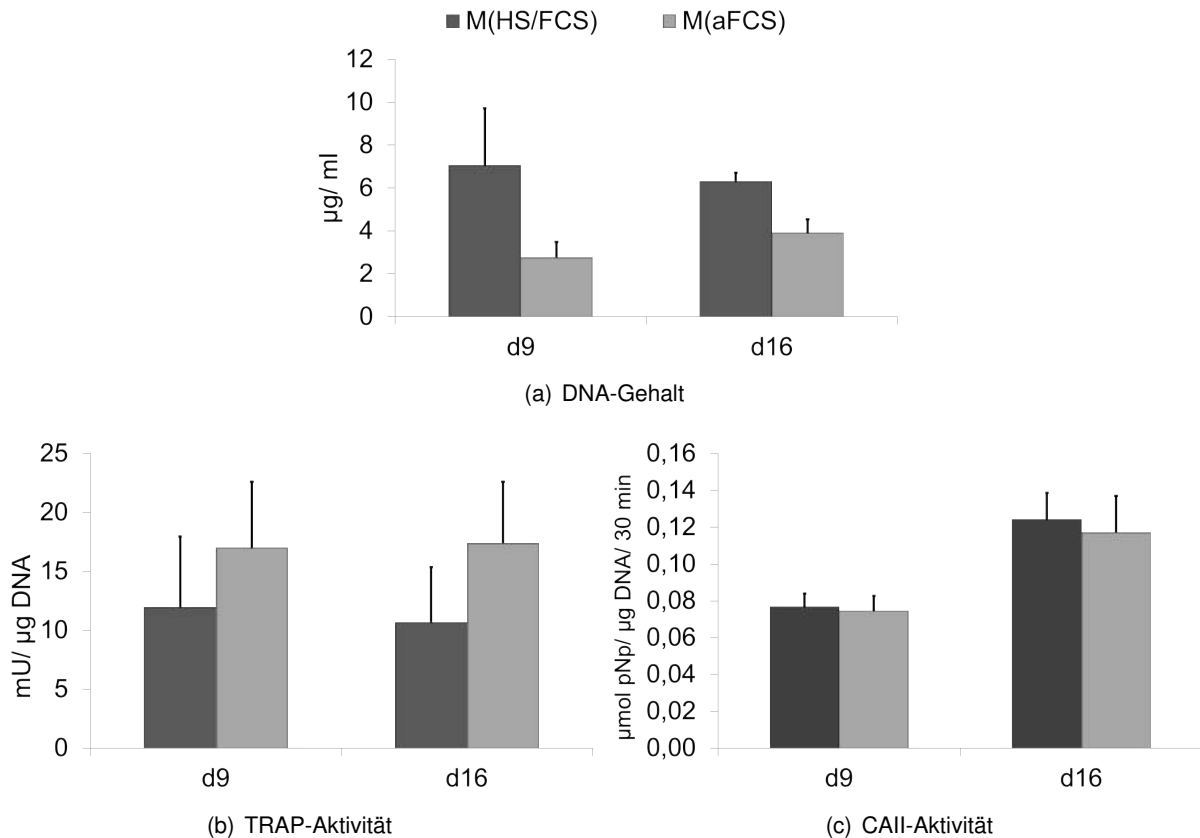


Abbildung 4.20.: Messwerte für DNA-Gehalt (a), TRAP-Aktivität (b) und CAII-Aktivität (c) von Osteoklasten 6 verschiedener Spender (B C, D, F, I und J; je $n_x=5$) mit $n=30$ auf Polystyrol zum Zeitpunkt d9 bzw. d16 unter Einfluss von M(HS/FCS) beziehungsweise M(aFCS). Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen.

In Abbildung 4.21 wird der Einfluss der verschiedenen Medien auf DNA-Gehalt, TRAP-, CAII- sowie Kathepsin K-Aktivität osteoklastärer Zellen auf mineralisiertem Kollagentape dargestellt. Es konnten hinsichtlich des DNA-Gehalts sowie der TRAP- und CAII-Aktivität keine signifikanten Unterschiede zwischen den getesteten Medien festgestellt werden. Bei der Darstellung der Daten von Spender I, C und F für den Vergleich zwischen M(HS/FCS) und M(aFCS) (siehe Abb. D.4 in D) konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede detektiert werden. Bei der statistischen Auswertung der Kathepsin K-Aktivität zeigte sich nach 16 Tagen Kultivierung eine signifikant höhere Aktivität des Enzyms bei

4.9. Einfluss des Kultivierungsmediums auf die Osteoklastogenese

den Zellen, die mit M(HS/FCS) kultiviert wurden.

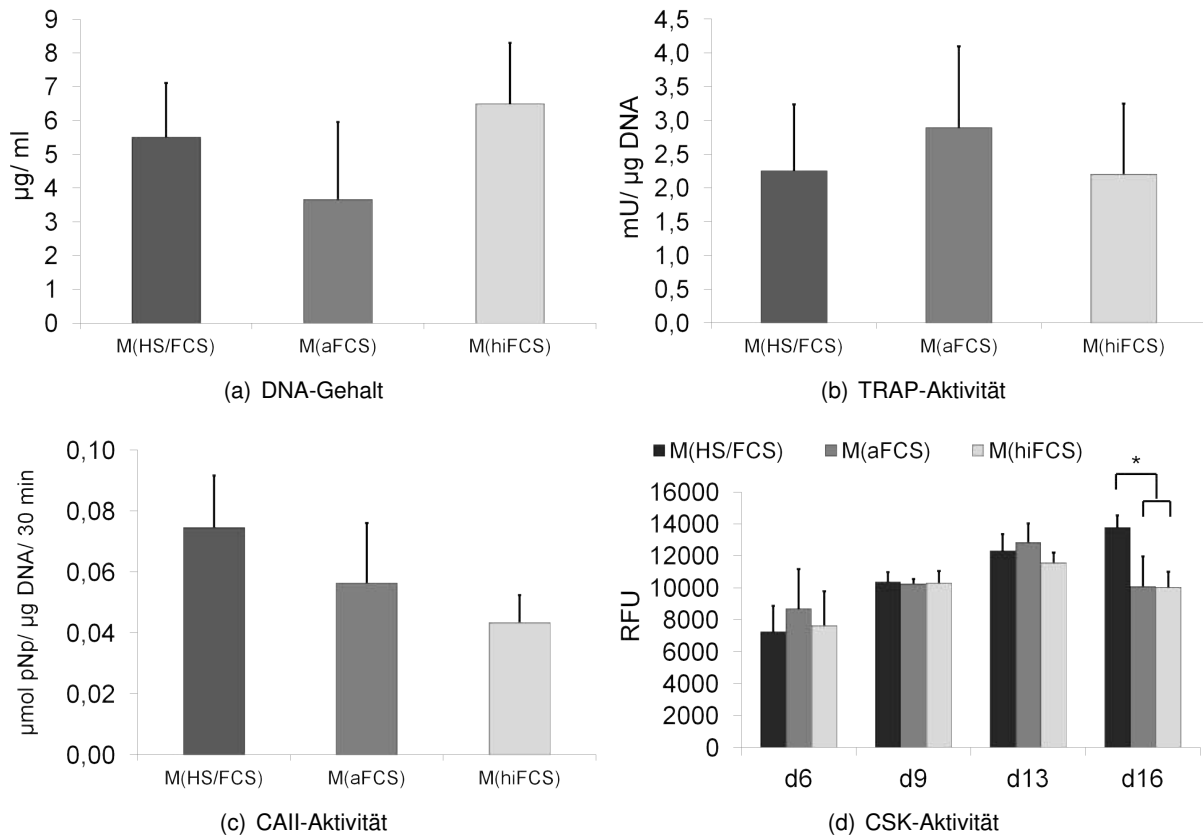


Abbildung 4.21.: DNA-Gehalt (a), TRAP-Aktivität (b), CAII-Aktivität (c) und CSK-Aktivität (d) osteoklastärer Zellen (Spender I, n=5) auf mineralisiertem Kollagentape nach 16 Tagen Kultivierung unter Zusatz von M-CSF und RANKL. Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen, * p < 0,05.

Abbildung 4.22 zeigt den Einfluss von M(HS/FCS) und M(aFCS) auf die Osteoklastogenese von mononuklearen Vorläuferzellen auf mineralisierter Kollagenmatrix. Die Messdaten zeigten, dass die Zusammensetzung des verwendeten Mediums keinen signifikanten Einfluss auf den DNA-Gehalt (Abb.4.22 a) und die CAII-Aktivität (Abb.4.22 c) der Proben hatte. Die TRAP-Aktivität der Osteoklasten, die mit M(HS/FCS) kultiviert wurden, war zum Zeitpunkt d9 signifikant höher als die TRAP-Aktivität der unter M(aFCS) kultivierten Zellen (Abb.4.22 b). Hinsichtlich der Kathepsin K-Aktivität der Osteoklasten ergaben sich signifikant höhere Messwerte unter M(aFCS) zum Zeitpunkt d9 sowie d16 (Abb. 4.22 d).

Die zusammenfassende Betrachtung der erhobenen Daten und der histochemisch gefärbten Polystyrolproben deutet darauf hin, dass M(HS/FCS) einen positiven Einfluss auf die Kultivierung von Osteoklasten hat. Unter M(HS/FCS) bildeten sich tendenziell größere Osteoklasten mit mehr Kernen, als unter M(aFCS) oder M(hiFCS) (siehe Abb. 4.18). Weiterhin wurden unter M(HS/FCS) oft höhere DNA-Gehalte und Enzymaktivitäten der Proben gemessen, als und unter den Vergleichsmedien. Die-

4. Ergebnisse und Diskussion

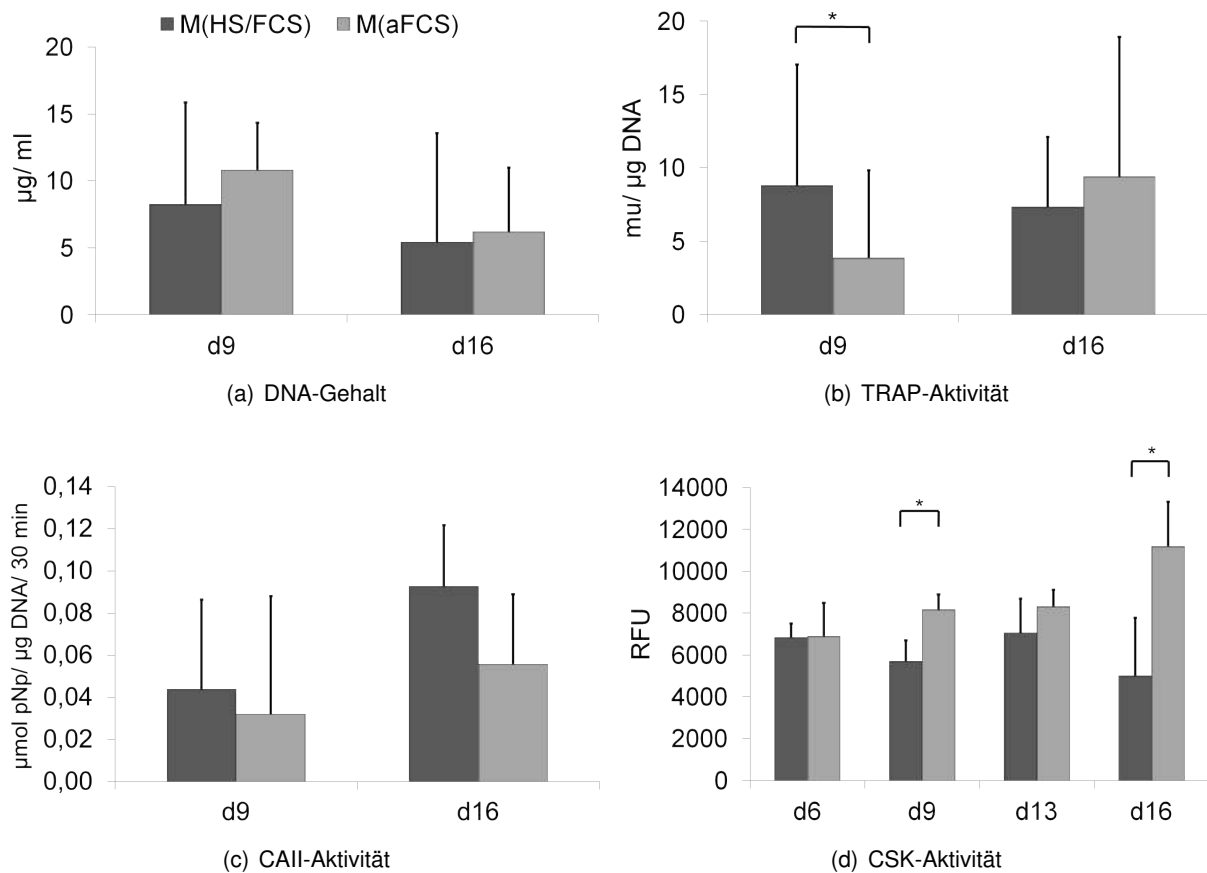


Abbildung 4.22.: Osteoklastogenese von PBMC unter Zusatz von M-CSF und RANKL auf mineralisiertem Kollagen mit M(HS/FCS) und M(aFCS). Daten für DNA-Gehalt (a), TRAP-Aktivität (b) sowie CAII-Aktivität (c) von Spender A, B und C (je $n_x=5$) mit $n=15$. Daten für die CSK-Aktivität (d) zum Zeitpunkt d9, d13 und d16 von Spender A und B (je $n_x=5$) mit $n=10$ und für d6 von Spender A, B und C (je $n_x=5$) mit $n=15$. Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen, * $p < 0,05$.

se Beobachtungen ähneln ebenfalls bereits früheren Ergebnissen der Arbeitsgruppe. Schlussfolgernd wirkt sich Humanserum, wie es im Standardmedium M(HS/FCS) enthalten ist, scheinbar fördernd auf die Osteoklastogenese und Aktivität osteoklastenspezifischer Enzyme. Möglicherweise enthält es zusätzliche Faktoren beziehungsweise Proteine, die in aktivem FCS nicht oder in nicht ausreichenden Mengen vorhanden sind, sich aber positiv auf die Kultivierung der Zellen auswirken.

4.10. Osteoklastogenese auf anderen Biomaterialien

In den bisher beschriebenen Experimenten wurden die Differenzierung von Monozyten zu Osteoklasten und deren Resorptionsverhalten beziehungsweise deren Enzymaktivitäten untersucht. In weiteren Versuchen wurden neben mineralisiertem Kollagentape zusätzlich andere Biomaterialien mit Monozyten besiedelt, zur osteoklastären Differenzierung angeregt und anschließend ebenfalls biochemisch und mikroskopisch untersucht. Ziel hierbei war es, das Resorptionsverhalten von Osteoklasten auf den verschiedenen Materialien zu beurteilen und ebenfalls in Zusammenhang mit den Enzymaktivitäten zu setzen. Hierbei sollte insbesondere der Frage nachgegangen werden, ob die Kathepsin K-Aktivität in den Zellkulturüberständen mit der Bildung mehrkerniger Osteoklasten und/ oder der Resorptionsaktivität korreliert.

Ein innovatives Material zur Untersuchung osteoklastärer Resorption *in vitro* ist von Osteoblasten sezerniertes mineralisiertes Kollagen. Eine solche Matrix wurde wie von Lutter et al. beschrieben (Lutter et al., 2010) in 48-Well Zellkulturplatten hergestellt und von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden mit jeweils 6×10^5 Monozyten besiedelt. Der Versuch wurde mit vier verschiedenen Spendern (A, B, C und D) durchgeführt, wobei jeweils 5 Proben pro Spender und Zeitpunkt besiedelt wurden (Ausnahme: zum Zeitpunkt d9 konnten für die Proben der mineralisierten Kollagenmatrix von nur drei Spendern, A, B und C, Daten erhoben werden). Die biochemisch bestimmten Daten wurden nach der statistischen Auswertung mittels *Zweifacher ANOVA mit wiederholten Messungen* grafisch in Abb. 4.23 dargestellt. In Abb. 4.23 (d) wurden signifikante Unterschiede aufgrund der Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet. Zu allen Messzeitpunkten sind die CSK-Aktivitäten der Polystyrolproben jeweils signifikant geringer als die Aktivitäten der Tape- und der Kollagenmatrixproben. Zu den Zeitpunkten d13 und d16 unterschieden sich zudem Tape und Kollagenmatrix signifikant voneinander. Auf mineralisierter Kollagenmatrix stieg die Kathepsin K-Aktivität im Zeitverlauf der Kultivierung bis zum Zeitpunkt d13 an. Diese Ergebnisse sprechen für eine Resorptionsaktivität der sich ausdifferenzierenden Osteoklasten auf dem Material. Zum Zeitpunkt d16 sank der Mittelwert aus den CSK-Aktivitäten der Zellen aller vier Spender wieder ab, auch wenn es bei einzelnen Spendern teilweise noch zum Anstieg der CSK-Aktivität kam. Es zeigten sich auch bei diesem Experiment wieder spenderabhängig interindividuelle Unterschiede der Messwerte. Bei der Betrachtung der Einzelmesswerte wurden vor allem bei Spender A zum Zeitpunkt d16 geringere Aktivitäten verzeichnet, Spender B und C hingegen zeigten weniger stark abfallende Messwerte (Daten nicht gezeigt).

Weiterhin wurden Osteoklasten auf humanen Knochenscheiben, im weiteren auch *bone chips* genannt, kultiviert, die zuvor mittels CO₂-Autoklaven entfettet und sterilisiert wurden (siehe 3.6). Die humanen *bone chips* wurden in 48-Well-Zellkulturplatten gegeben und jeweils mit 4×10^6 Zellen besiedelt. Es wurde bewusst eine höhere Zellzahl verwendet, da anzunehmen ist, dass aufgrund der porösen Struktur der Scaffolds ein beträchtlicher Teil der Zellen nicht an diesen, sondern an der Polystyroloberfläche adhären wird. Mittels konfokaler LSM-Untersuchung fluoreszenzgefärbter Proben konnten mehrkernige Osteoklasten auf den *bone chips* nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.24).

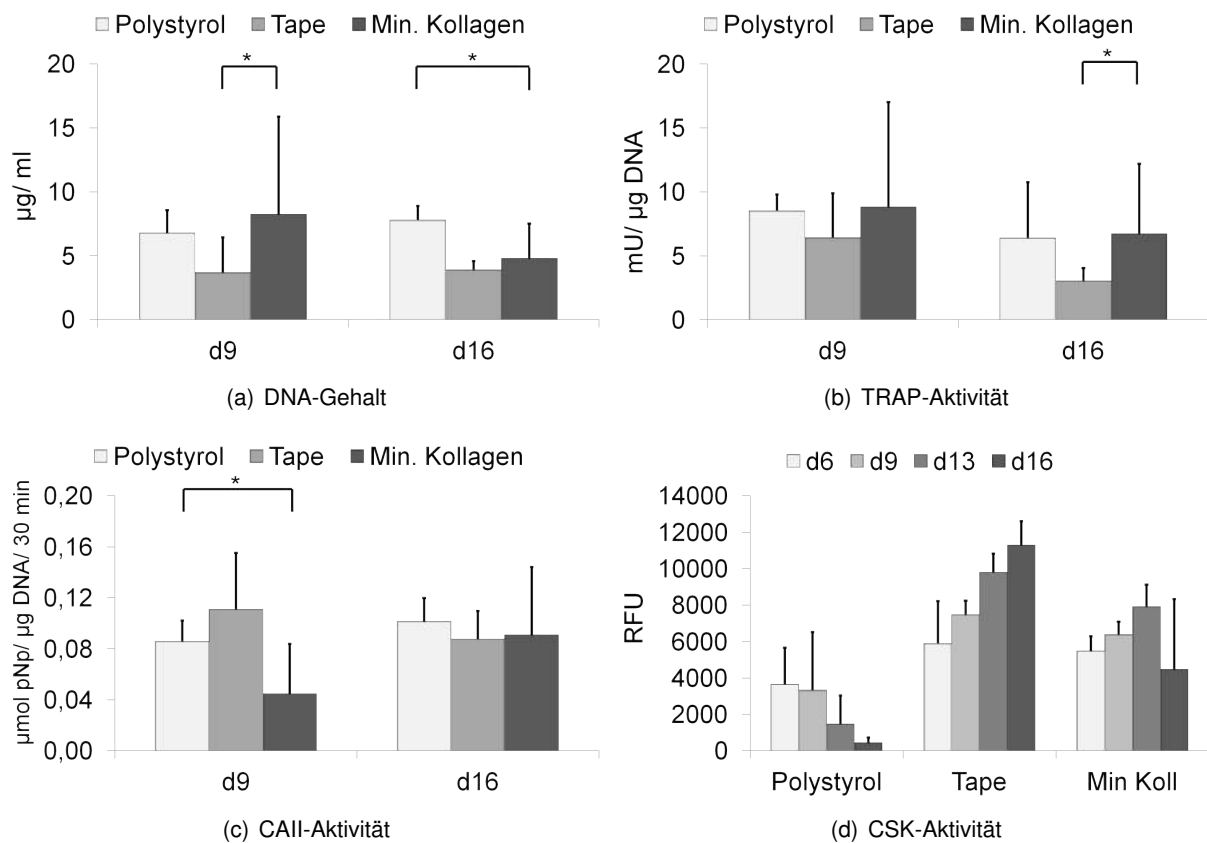


Abbildung 4.23.: DNA-Gehalt (a), TRAP-Aktivität (b), CAII-Aktivität (c) und CSK-Aktivität (d) osteoklastärer Zellen unter Einfluss von M-CSF und RANKL auf Polystyrol, Tape und mineralisiertem Kollagen. In (a), (b) und (c) für d9 (Spender A, B und C mit je $n_x=5$) $n=15$; für d16 (Spender A, B, C und D mit je $n_x=5$) mit $n=20$. In (d) für d6, d9 und d13 (Spender A, B, C und D je $n_x=5$) mit $n=20$, für d16 (Spender A, B und C je $n_x=5$) mit $n=15$. Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichungen, * $p < 0,05$.

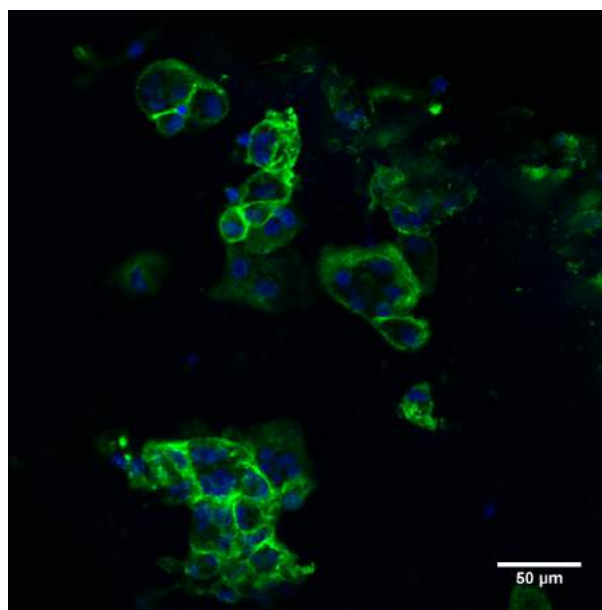


Abbildung 4.24.: Konfokale LSM-Aufnahme von osteoklastenähnlichen Zellen auf einem *bone chip* nach 15 Tagen Kultivierung unter Zusatz von M-CSF und RANKL. Maßbalken entspricht 50 µm

In einem weiteren Telexperiment wurden Monozyten auf reinem Kollagengel gesiedelt. Hierbei wurden zwei Zellzahlen getestet, da die optimale Besiedlungszellzahl auf diesem Material noch unbekannt ist. Aufgrund der glatten Oberfläche, dem Polystyrol ähnlich, ist möglicherweise eine Zellzahl von 3×10^5 ausreichend. Betrachtet man jedoch die Tatsache, dass Kollagen von den Osteoklasten abgebaut werden kann und das Material sich somit möglicherweise positiv auf die Ausdifferenzierung der Monozyten zu mehrkernigen Osteoklasten auswirkt, könnte sich eine höhere Zellzahl von 6×10^5 Zellen ebenfalls positiv auf die Bildung großer, mehrkerniger Osteoklasten auswirken. Das Experiment wurde mit drei verschiedenen Spendern (A, B und D) durchgeführt. Abbildung 4.25 zeigt eine konfokale LSM-Aufnahme fluoreszenzgefärbter mehrkernige Osteoklasten auf einer Kollagengelprobe, die mit 6×10^5 Zellen besiedelt wurde.

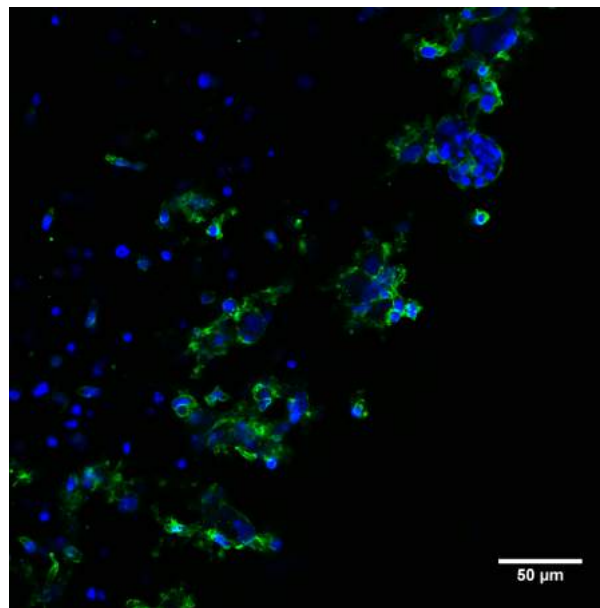


Abbildung 4.25.: Konfokale LSM-Aufnahme von osteoklastenähnlichen Zellen auf Kollagengel nach 16 Tagen Kultivierung unter Zusatz von M-CSF und RANKL. Maßbalken entspricht 50 µm.

In Abb. 4.26 sind die biochemischen Messdaten des Versuchs, der mit drei Spendern durchgeführt wurde, dargestellt. Es ergaben sich bei der geringeren Zellzahl von 3×10^5 Zellen pro Probe für die TRAP- und die CAII-Aktivitäten jeweils höhere Werte, als bei den Proben mit höherer Besiedlungszellzahl. Bei der Kathepsin K-Aktivität hingegen konnten in den Überständen der Proben mit höherer Zellzahl auch höhere Werte als bei geringerer Zellzahl gemessen werden. Mit Ausnahme der Kathepsin K-Aktivität zum Zeitpunkt d6 waren die Unterschiede zwischen den CSK-Aktivitäten der verschiedenen Besiedlungszelldichten jedoch nicht signifikant. Unabhängig von der Besiedlungszelldichte ist jedoch erkennbar, dass die Kathepsin K-Aktivitäten der Osteoklasten auf Kollagengel bis zum Zeitpunkt d13 anstiegen und zum Zeitpunkt d16 wieder leicht absanken. Der Aktivitätsanstieg ist vergleichbar mit dem Verhalten der CSK-Aktivität der Osteoklasten, die auf mineralisiertem Kollagengewebe kultiviert wurden. Dieses Verhalten kann ebenfalls mit der fortschreitenden Ausdifferenzierung der Zellen und der somit zunehmenden Resorptionsaktivität erklärt werden.

In weiteren Experimenten wurden *bone chips* entweder in Kollagengel oder in Alginategel gebettet und

4.10. Osteoklastogenese auf anderen Biomaterialien

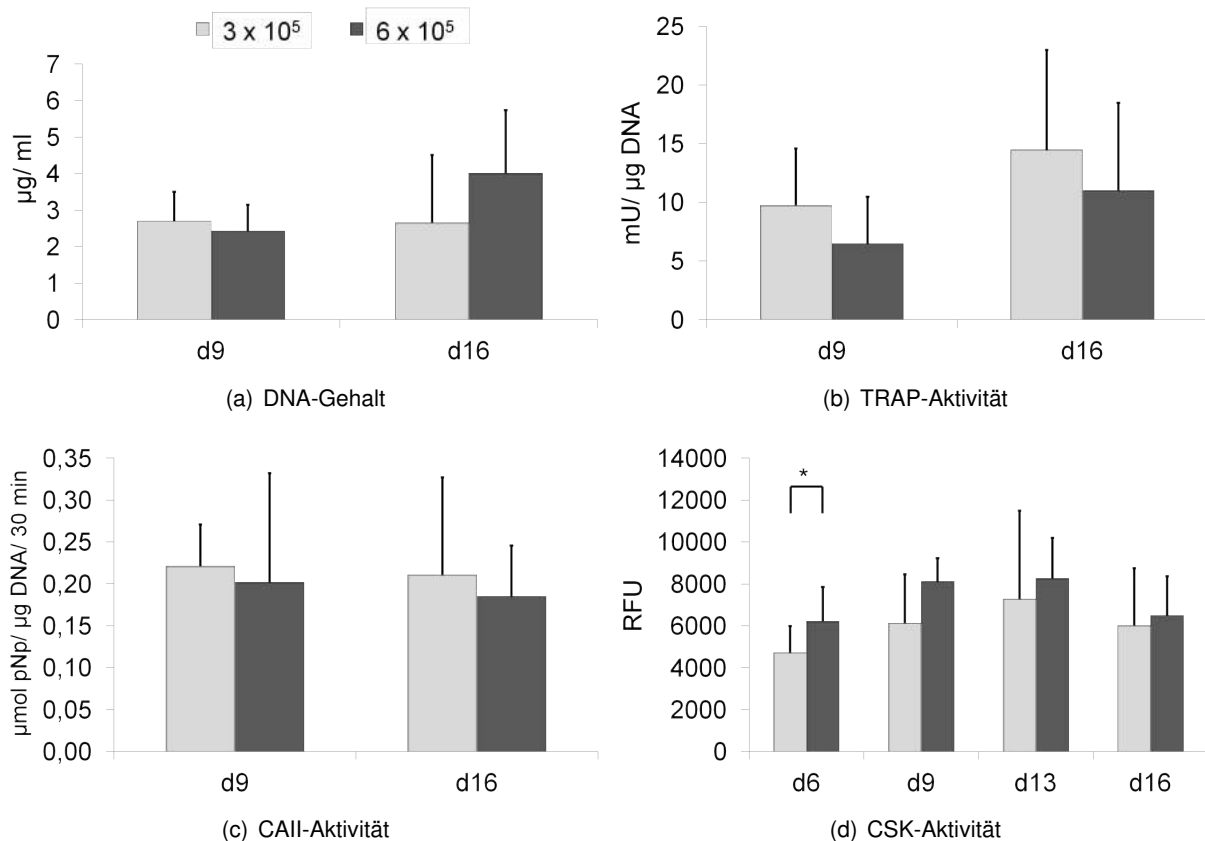


Abbildung 4.26.: DNA-Gehalt (a), TRAP-Aktivität (b), CAII-Aktivität (c) und CSK-Aktivität (d) osteoklastärer Zellen unter Einfluss von M-CSF und RANKL auf Kollagengel, (a), (b) und (c) (Spender A, B und D mit je $n_x=4$) mit $n=12$, (d) (Spender A, B und D mit je $n_x=5$) mit $n=15$, Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichungen, * $p < 0,05$. Besiedlungszellzahl von 3×10^5 (hellgrau) und 6×10^5 (dunkelgrau) im Vergleich.

anschließend mit PBMC von Spender A besiedelt. Durch die Einbettung in Gel sollte eine Besiedlung der Polystyroloberfläche mit Osteoklasten und damit veränderte Messwerte verhindert werden. Wie in anderen Experimenten dieser Arbeit deutlich wurde, entwickelten Osteoklasten auf nicht resorbierbaren Polystyroloberflächen eine hohe TRAP-Aktivität. Gelangen Zellen durch den Besiedlungsvorgang der porösen *bone chips* zugleich auf Polystyrol, werden möglicherweise falsch hohe Enzymaktivitäten bei der nachfolgenden biochemischen Analyse ermittelt. Bei der Besiedlung dieser in Gel eingebetteten *bone chips* wurde eine Zellzahl von 6×10^5 pro Probe verwendet. Alginate hat die Eigenschaft, die Adhärenz von Zellen zu hemmen. Als Grund dafür wird die polyanionische Oberfläche, welche zur Abstoßung ebenfalls polyanionischer Glykokalyxbestandteile von Zellen führt, angenommen (Ehrhart, 2011). Zudem ist die Oberfläche von Alginategelen sehr glatt, wodurch die Adhärenz ebenfalls behindert wird. Diese negative Wirkung auf die Zelladhärenz auf dem Gel sollte genutzt werden, um die Adhäsion der Monozyten an der Oberfläche der *bone chips* zu fördern. Aus diesem Grund wurden einige *bone chips* in Alginategel eingebettet und anschließend mit Monozyten besiedelt. Zum Vergleich

wurden ebenfalls reine Alginatgele mit Monozyten besiedelt und kultiviert. Die biochemischen Messdaten der reinen sowie der in den Gelen eingebetteten *bone chips* und der reinen Gele sind in den Abbildungen 4.27, 4.28 und 4.29 dargestellt. Die hier erhobenen Daten stammen nur von Spender A. In den Grafiken sind aus Gründen der Übersichtlichkeit keine signifikanten Unterschiede zwischen den Proben gekennzeichnet. Grafiken mit Kennzeichnung signifikanter Unterschiede können im Anhang eingesehen werden (siehe Abb. D.6 und Abb. D.7 in D).

Bei der Betrachtung der Kathepsin K-Aktivitäten der Osteoklasten auf reinen *bone chips* sowie auf den in Kollagen- beziehungsweise Alginatgel eingebetteten *bone chips* fällt auf, dass die Messwerte relativ gering sind und im Zeitverlauf keinen deutlichen Ansteigen oder Absinken zu verzeichnen ist. Da Knochen eine gut resorbierbare Oberfläche für Osteoklasten darstellt, könnten die geringen Werte möglicherweise mit einer verminderten oder zu langsamen Adhärenz der Zellen an die Knochenoberfläche erklärt werden. Aufgrund des Mediumwechsels nach der initialen Adhärenzphase, könnten nicht adhärenzte Monozyten aus den Proben gewaschen worden sein, wodurch die mögliche Anzahl sich bildender mehrkerniger Osteoklasten reduziert wurde, somit also auch die Gesamtenzymaktivität des Kathepsin K. Weiterhin könnte das Verfahren der CO₂-Sterilisation unter Einsatz der chemischen Zusätze negativen Einfluss auf das Zellwachstum haben. Mittels superkritischem CO₂ wurden die *bone chips* zunächst in mehreren Zyklen ohne Zusatz von Chemikalien entfettet. Möglicherweise waren die durchgeführten Zyklen noch nicht ausreichend, sodass noch vorhandenes Fett auf der Knochenoberfläche die Adhärenz der Monozyten verhindert hat. Wie schon zuvor erwähnt, gab es bei den Messwerten der Spender starke interindividuelle Unterschiede. In Abb. 4.29 (a) sind die Daten von Spender A allein aufgetragen, wohingegen in Abb. 4.26 (d) die CSK-Aktivitäten der Spender A, B und D gemeinsam mittels *Zweifacher ANOVA mit wiederholten Messungen* ausgewertet und anschließend dargestellt wurden. Spender A einzeln zeigte im Zeitverlauf ein Absinken der Kathepsin K-Aktivität, wohingegen die durchschnittlichen Daten mehrerer Spender relativ konstante, im Trend eher ansteigende Enzymaktivitäten zeigten. Diese Messergebnisse können daher nur schwer interpretiert werden. Eine erneute Durchführung des Versuches mit weiteren Spendern wäre eine Möglichkeit, um den Verlauf der Kathepsin K-Aktivität von Osteoklasten auf Kollagengel genauer beurteilen zu können. Auf Alginatgel kultivierte Osteoklasten von Spender A zeigten eine im Zeitverlauf ansteigende Enzymaktivität des Kathepsin K. Die Messdaten wiesen jedoch hohe Standardabweichungen auf. Möglicherweise bildeten sich, aufgrund der erschwerten Adhärenz der Zellen auf der Alginatoberfläche, wenige Herde mit Zellakkumulationen aus, die lokal zu großen, mehrkernigen Osteoklasten differenzierten und hohe Enzymaktivitäten ausbildeten. Auch dieser Versuch sollte mit mehreren Spender wiederholt werden, um das Verhalten der Osteoklasten auf Alginatgel genauer beurteilen zu können.

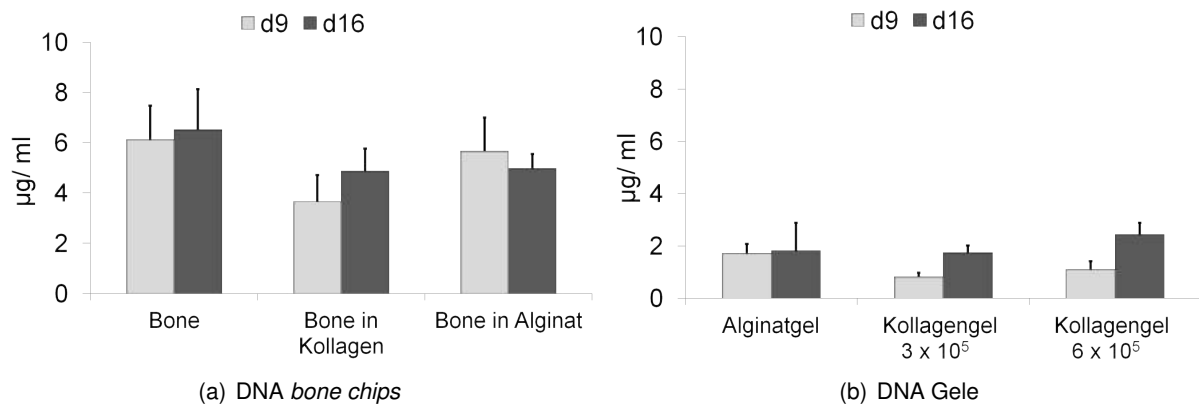


Abbildung 4.27.: Osteoklastogenese von PBMC (Spender A) unter Zusatz von M-CSF und RANKL auf verschiedenen Materialien. Besiedlungszellzahl auf *bone chips* 4×10^6 Zellen, auf *bone chips* in Kollagen sowie *bone chips* in Alginat jeweils 6×10^5 Zellen. Zum Zeitpunkt d9 n=3 und zum Zeitpunkt d16 n=4. Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen des DNA-Gehalts der Proben.

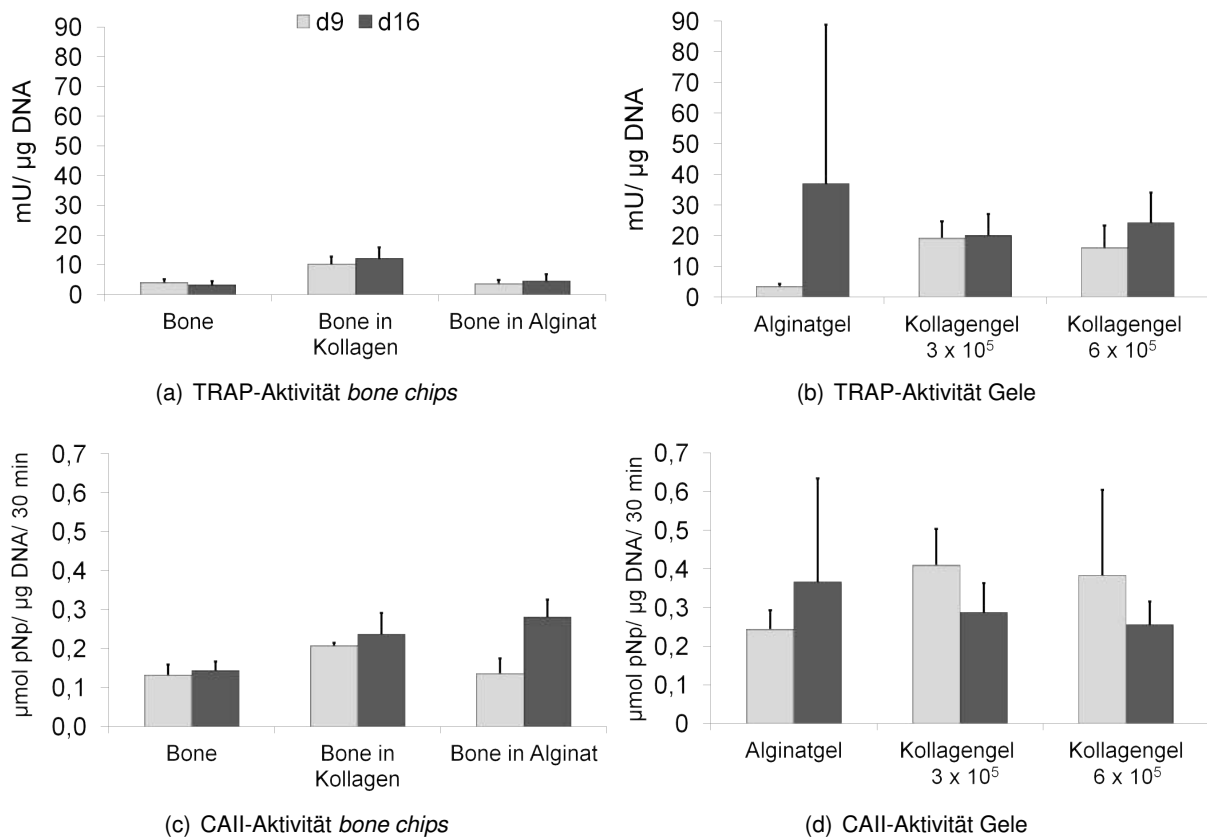


Abbildung 4.28.: Osteoklastogenese von PBMC (Spender A) unter Zusatz von M-CSF und RANKL auf verschiedenen Materialien. Besiedlungszellzahl auf *bone chips* 4×10^6 Zellen, auf *bone chips* in Kollagen- sowie in Alginatgel jeweils 6×10^5 Zellen. Zum Zeitpunkt d9 n=3 und zum Zeitpunkt d16 n=4. Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der TRAP-Aktivitäten (a, b) und CAII-Aktivitäten (c, d) der Proben.

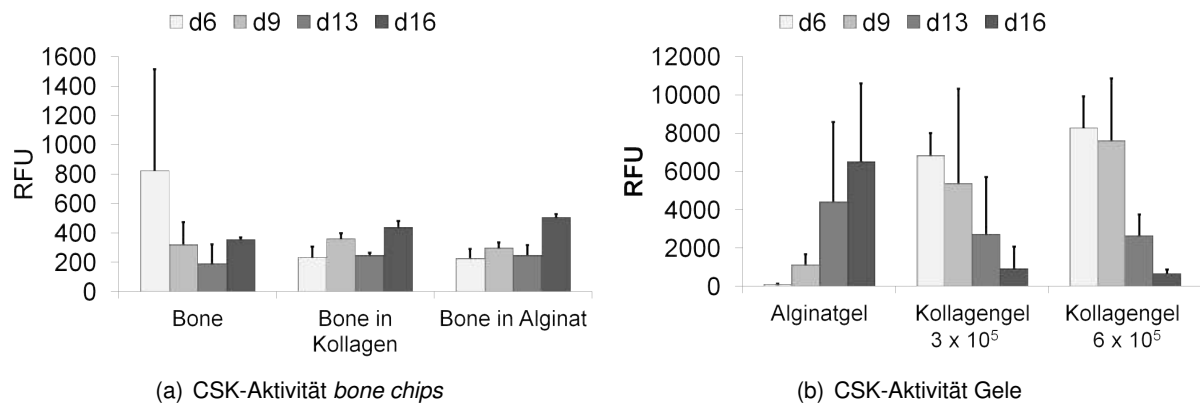


Abbildung 4.29.: Osteoklastogenese von PBMC (Spender A mit $n=4$ für jeden Zeitpunkt) unter Zusatz von M-CSF und RANKL auf verschiedenen Materialien. Besiedlungszellzahl auf auf *bone chips* 4×10^6 Zellen, auf *bone chips* in Kollagen- sowie in Alginatgel jeweils 6×10^5 Zellen. Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Kathepsin K-Aktivitäten der Proben.

5. Zusammenfassung

Osteoklasten sind Zellen hämatopoetischen Ursprungs und im menschlichen Körper für die Resorption von Knochen verantwortlich. Die Untersuchung und Quantifizierung dieses Resorptionsprozesses stellt eine wichtige Grundlage für verschiedene Forschungsbereiche dar, beispielsweise für die Entwicklung bioresorbierbarer Knochenersatzmaterialien oder für die Untersuchung der Wirksamkeit von Medikamenten zur Resorptionshemmung. Zur Beurteilung der Differenzierung von Monozyten zu mehrkernigen Osteoklasten und der osteoklastären Resorptionsaktivität werden verschiedene osteoklastenspezifische Marker eingesetzt. Geeignet dafür sind beispielsweise der Nachweis von Vielkernigkeit, die genanalytische Bestimmung osteoklastenspezifischer Enzyme, der Nachweis der Enzymaktivitäten sowie die Messung von Kalziumionenkonzentrationen im Überstand der Zellkulturen.

Ziel dieser Arbeit war es, biochemische Verfahren zur Quantifizierung der osteoklastären Resorptionsaktivität zu optimieren. Dabei sollte die biochemische Bestimmung der Enzymaktivität von Kathepsin K (CSK) im Zellkulturüberstand als Marker für osteoklastäre Resorptionsaktivität etabliert werden. Die Untersuchungen sollen es auf lange Sicht ermöglichen, osteoklastäre Resorptionsaktivität nachzuweisen und zu quantifizieren, sodass auf kostenintensive und zeitaufwändige elektronenmikroskopische Untersuchungsmethoden verzichtet werden kann.

Monozyten wurden für die Besiedlung der Proben aus humanen Leukozytenkonzentraten isoliert und auf verschiedenen Modellsubstraten kultiviert. Der überwiegende Teil der Untersuchungen wurde mit Tapes aus biomimetisch mineralisiertem Kollagen durchgeführt. Zum Vergleich wurden Osteoklasten außerdem auf Polystyrol, von Osteoblasten produzierter mineralisierter Kollagenmatrix, Kollagengel, Alginategel und *bone chips* kultiviert. Die Monozyten wurden mittels M-CSF und RANKL zur osteoklastären Differenzierung angeregt. Es sollten verschiedene Einflussfaktoren auf die Osteoklastogenese *in vitro* evaluiert werden, um die Kultivierung in zukünftigen Experimenten zu optimieren.

Enzymaktivitäten der Zellen (tartratresistente saure Phosphatase (TRAP), Carboanhydrase II (CAII) und Kathepsin K (CSK)) wurden gemessen und auf Korrelation mit der osteoklastären Differenzierung von Monozyten und deren Resorptionsaktivität untersucht.

Der Einfluss von hitzeinaktiviertem FCS (hiFCS) auf die Zelladhärenz, der Einfluss der Oberflächenrauigkeit sowie des Gehalts an Hydroxylapatit (HA) der Tapes auf Zellzahl und Aktivität osteoklastärer Enzyme wurden untersucht. Weiterhin wurden die Zusammensetzung des Zellkulturmediums sowie der Einfluss des pH-Wertes des Mediums auf die Osteoklastogenese getestet.

Die Inkubation unbesiedelter Proben mit hiFCS führte später zu einer geringeren Adhärenz der Monozyten auf der Oberfläche, weshalb die Proben für weitere Experimente vor der Besiedlung in hiFCS-freiem Medium inkubiert wurden.

Medium, welches Humanserum (HS) und hiFCS enthielt, förderte im Vergleich zu anderen Medien-

zusammensetzungen die Osteoklastogenese und führte zur Bildung größerer Osteoklasten auf Polystyrol.

Auf den eingesetzten Standardtapes konnte keine Aussage zur Entstehung von Resorptionspits getroffen werden, da die Unterscheidung zwischen der ursprünglich rauen Oberfläche und neu entstandenen Pits mit den zur Verfügung stehenden Messmethoden nicht möglich war.

Um dieses Problem zu lösen, wurde versucht Tapes mit glatterer Oberfläche herzustellen. Diese wurden mit Monozyten besiedelt und nach der Kultivierung und Differenzierung zu Osteoklasten mittels Rasterelektronenmikroskop (REM) untersucht. Auf den glatten Tapes konnten Resorptionspits nachgewiesen werden. Zudem konnten mittels fluoreszenzmikroskopischer Untersuchung auf den glatteren Tapes morphologisch größere mehrkernige Osteoklasten nachgewiesen werden als auf den Standardtapes. Die Enzymaktivitäten der Proben mit glatterer und rauerer Oberfläche unterschieden sich jedoch nicht signifikant.

Biochemische Messdaten zeigten, dass der HA-Gehalt der mineralisierten Tapes die Osteoklastogenese und die Resorptionsaktivität der Zellen beeinflusst. Auf Tapes mit sehr geringem HA-Gehalt konnten große mehrkernige Osteoklasten nachgewiesen werden. Durch die Schwierigkeit der Herstellung von Tapes mit geringerem Mineralgehalt konnten diese Daten jedoch nicht reproduziert werden. Es ist nötig, eine standardisierte Methode zur Herstellung von Tapes mit glatterer Oberfläche und einem geringeren HA-Gehalt zu entwickeln, um den Einfluss beider Faktoren näher zu untersuchen.

Die osteoklastäre Differenzierung von Monozyten nahm mit sinkendem pH-Wert des Mediums ab. Bei einem pH-Wert von 6,4 waren lediglich mononukleare, spindelförmige Zellen in größeren Mengen nachweisbar. Die Aktivität von CSK nahm ebenfalls mit sinkenden pH-Wert des Mediums ab. Die Messung der Kalziumionenkonzentration ist bei dem eingesetzten mineralisierten Kollagentape als Marker für osteoklastäre Aktivität nicht geeignet, da freigesetzte Kalziumionen von dem Material offensichtlich wieder gebunden werden.

Bei der Untersuchung der Osteoklastogenese auf verschiedenen Modellsubstraten erwies sich die von Osteoblasten mineralisierte Kollagenmatrix als ebenfalls gut geeignetes Material. Überraschend waren die Messergebnisse der CSK-Aktivität in den Überständen der Osteoklasten auf Kollagengel. Die Enzymaktivität war ähnlich gering wie in den Überständen von auf Polystyrol kultivierten Osteoklasten und nahm im Zeitverlauf ab. Verantwortlich dafür könnten spenderabhängige Einflussfaktoren sein. Um eine klare Aussage treffen zu können ist es daher nötig, den Versuch mit Zellen weiterer Spender zu wiederholen.

In allen durchgeführten Experimenten konnten große interindividuelle Unterschiede im Verhalten der Zellen verschiedener Spender festgestellt werden. Zukünftig sollte jeder Versuch mit möglichst vielen Einzelspendern durchgeführt werden, um diese Einflüsse berücksichtigen zu können und die Daten anhand erkennbarer Trends zu interpretieren. Eine Besiedlung von Proben mit gepoolten Zellen verschiedener Einzelspender ist nicht empfehlenswert.

Die Messung der Enzymaktivität von CSK in Zellkulturüberständen kann als zusätzlicher Marker für

die Beurteilung osteoklastärer Resorptionsaktivität *in vitro* eingesetzt werden. Die CSK-Aktivität der Zellen auf resorbierbaren Materialien stieg im Zeitverlauf an, auf Polystyrol hingegen sank sie. Die CAII-Aktivität der Osteoklasten auf resorbierbaren Materialien zeigte ein ähnliches Verhalten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Enzymaktivitäten von CSK und CAII mit der Differenzierung von Monozyten zu Osteoklasten korrelieren.

Im Gegensatz dazu konnten auf nicht resorbierbaren Polystyrolproben hohe TRAP-Aktivitäten gemessen werden. Zusätzlich konnte mittels histochemischer Anfärbung auch in mononuklearen, spindelförmigen Zellen große Mengen des Enzyms nachgewiesen werden. Schlussfolgernd eignen sich die Messung der TRAP-Aktivität sowie die histochemische Anfärbung des Enzyms nicht optimal als osteoklastäre Resorptionsmarker. Die Ergebnisse sprechen eher dafür, dass die TRAP in jedem Falle von Monozyten gebildet wird, die mittels M-CSF und RANKL zur osteoklastären Differenzierung angeregt wurden, unabhängig davon ob sich tatsächlich Osteoklasten bildeten bzw. eine Resorptionsaktivität vorliegt.

Zukünftige Experimente sollten sich daher eher auf die Messung der CSK-Aktivität konzentrieren, um sie als zuverlässigen Marker für osteoklastäre Differenzierung und des Resorptionsverhaltens *in vitro* zu etablieren. Zu Beginn könnte eine Korrelation zwischen CSK-Aktivität der Osteoklasten, gemessen auf Tapes mit glatter Oberfläche, und den mittels REM detektierbaren Resorptionspits hergestellt werden. Zusätzlich zur Messung der CSK-Aktivität in den Überständen der Zellkulturen kann die Enzymaktivität auch in den Lysaten osteoklastärer Zellen nachgewiesen werden, wenn ein anderes Substrat verwendet wird.

Abschließend konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich zur Beurteilung der osteoklastären Resorption von Biomaterialien besonders die Enzymaktivitäten von CAII und CSK eignen, während die klassische TRAP-Aktivitätsmessung für diese Zwecke eher weniger geeignet erscheint.

6. Summary

Osteoclasts are cells of haematopoietic origin, responsible for the resorption of bone in the human body. Characterisation of the osteoclast resorption process is important for different fields of research, for example for the development of bioresorbable bone substitutes or for investigating the activity of medication which suppresses resorption activity. There are different specific markers to show the differentiation of mononuclear cells into multinuclear osteoclasts and to measure their resorption activity. Measurement of the serous enzyme activity and calcium ions in the cell culture supernatants, along with multinuclearity and genetical determination of osteoclast specific enzymes, are qualified to evaluate osteoclastic activity.

The aim of this thesis was to optimise biochemical measurement methods to quantify resorption activity of osteoclasts, focused on measuring the enzyme activity of cathepsin k in the supernatants of cell cultures and to establish this method as marker for osteoclastic resorption activity. These investigations are supposed to facilitate the detection and quantification of osteoclastic resorption, hence avoiding cost and time expensive electron microscopy.

After monocytes have been isolated from human leucocyte concentrates they were cultured on different substrates, especially on a membrane like biomimetic mineralised collagen. Moreover polystyrene, mineralised collagen matrix (produced by osteoblasts), collagen gel, alginate gel and bone chips have been used. Osteoclastic differentiation was induced by M-CSF and RANKL.

Different factors which can influence osteoclastogenesis and resorption activity of osteoclasts *in vitro* have been analysed to optimise future cell culture experiments. Enzyme activities of the cells (tartrate resistant acid phosphatase (TRAP), carboanhydrase II (CAII), cathepsin k (CSK)) have been measured to check any correlation to osteoclastic differentiation of monocytes and their resorption activity. The influence of heat inactivated FCS (hiFCS) was investigated with respect to cell adherence. Influence of surface roughness and hydroxyapatite (HA) content of the tapes on the cell proliferation and activity of osteoclastic enzymes were investigated. Additionally the composition of the cell culture medium as well as the pH level of the medium was tested.

Incubation of the samples with hiFCS had a negative influence on cell adherence. Hence samples were incubated in medium without hiFCS for further experiments. Medium that contains human serum and hiFCS seemed to support osteoclastogenesis and led to bigger osteoclasts on polystyrene surface.

On the used standard tapes it was not possible to quantify resorption pits because the distinction between original rough surface and new formed resorption pits was not possible with the available methods of measurement. Therefore a tape with a smoother surface was created. On those smooth tapes resorption pits were detectable in SEM and fluorescence stained samples showed bigger osteoclasts compared with more rough standard tapes. However, enzyme activity of osteoclasts on samples

with smooth and rough surface showed no significant difference.

The HA content of the tapes seems to influence the osteoclastogenesis and resorption activity of the cells. Big multinuclear osteoclasts have been detected in tapes with very low HA content. Though producing tapes with lower content of mineral is very difficult it was not possible to reproduce these data.

It is necessary to establish a standardised method to produce tapes with a smoother surface as well as a lower HA content to evaluate the influence of both factors more precisely.

Osteoclastic differentiation of monocytes decreased with decreasing pH level. At pH 6.4 only mononuclear spindle-shaped cells were observed in higher numbers. Activity of CSK also decreased with decreasing pH level. Measurement of calcium ion concentration as a marker for osteoclastic activity is not suitable because the used material is apparently binding released calcium ions.

While investigating osteoclastogenesis on different materials, mineralised collagen matrix that was produced by osteoblasts was proven to be a suitable material for this purpose. Surprisingly the enzyme activity of CSK in the supernatants of osteoclasts on collagen gel was as low as in the supernatants of osteoclasts which were cultivated on polystyrene. The activity also decreased by time. Donor dependent factors could be the reason. To verify these results it is necessary to repeat this experiment with cells of more donors.

All experiments have shown interindividual differences in the behavior of the cells of different donors. Future experiments should be performed with a larger number of donors to consider these influences and to interpret the data with due regard to forming trends. Cultivation of samples with mixed cells of different donors is not recommendable.

Measurement of CSK activity in the supernatants of cell cultures can be used as additional marker to evaluate osteoclastic resorption activity *in vitro*. CSK activity on resorbable samples increased with time, whereas on polystyrene it was decreasing. The activity of CAII of osteoclasts cultivated on resorbable materials showed similar behavior. These results show that the activity of CSK and CAII correlates with the osteoclastic differentiation of monocytes.

On the contrary TRAP activity on non resorbable polystyrene surfaces was high and histochemical staining of the enzyme showed that even mononuclear, spindle-shaped cells express TRAP in large amount. That leads to the conclusion that measurement of TRAP activity as well as histochemical staining of the enzyme are not optimally suitable as osteoclastic bone resorption marker. The results indicate that TRAP is produced by monocytes which were stimulated to form osteoclasts by M-CSF and RANKL however, whether or not they really form osteoclasts or they really show resorption activity is not confirmed.

Hence future experiments should focus more on the investigation of CSK activity to establish it as a reliable marker for osteoclastic differentiation and resorption behavior of osteoclasts *in vitro*. Initially measuring CSK activity on tapes with smoother surface could help to quantify the resorption activity by evaluating resorption pits in SEM and correlating the amount with the enzyme activity. Besides

measuring the CSK activity in the supernatants of cell cultures it is also possible to measure the enzyme activity in the cell lysates if a different substrate is used.

In conclusion this thesis shows that enzyme activity of CAll and CSK are both particularly suitable for the evaluation of osteoclastic resorption of biomaterials whereas measurement of TRAP activity is less suitable for this purpose.

7. Literaturverzeichnis

- Aguda AH, Panwar P, Du X, Nguyen NT, Brayer GD, Brömme D. 2014. Structural basis of collagen fiber degradation by cathepsin k. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:17474–17479.
- Akchurin T, Aissiou T, Kemeny N, Prosk E, Nigam N, Komarova SV. 2008. Complex dynamics of osteoclast formation and death in long-term cultures. *PloS one* 3:e2104.
- Alatalo SL, Halleen JM, Hentunen TA, Mönkkönen J, Väänänen HK. 2000. Rapid screening method for osteoclast differentiation in vitro that measures tartrate-resistant acid phosphatase 5b activity secreted into the culture medium. *Clin. Chem.* 46:1751–1754.
- Arnett TR, Dempster DW. 1986. Effect of ph on bone resorption by rat osteoclasts in vitro. *Endocrinology* 119:119–124.
- Arnett TR, Dempster DW. 1990. Perspectives: protons and osteoclasts. *J. Bone Miner. Res.* 5:1099–1103.
- Atley L, Mort J, Lalumiere M, Eyre D. 2000. Proteolysis of human bone collagen by cathepsin k: characterization of the cleavage sites generating the cross-linked n-telopeptide neoepitope. *Bone* 26:241–247.
- Bar-Shavit Z. 2007. The osteoclast: a multinucleated, hematopoietic-origin, bone-resorbing osteoimmune cell. *J. Cell. Biochem.* 102:1130–1139.
- Baron R, Neff L, Louvard D, Courtoy PJ. 1985. Cell-mediated extracellular acidification and bone resorption: evidence for a low ph in resorbing lacunae and localization of a 100-kd lysosomal membrane protein at the osteoclast ruffled border. *J. Cell Biol.* 101:2210–2222.
- Baron R. 1995. Molecular mechanisms of bone resorption an update. *Acta Orthop.* 66:66–70.
- Bennett S, Breit SN. 1994. Variables in the isolation and culture of human monocytes that are of particular relevance to studies of hiv. *J. Leukoc. Biol.* 56:236–240.
- Bernhardt A, Lode A, Boxberger S, Pompe W, Gelinsky M. 2008. Mineralised collagen - an artificial, extracellular bone matrix - improves osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 19:269–275.
- Bernhardt A, Thieme S, Domaschke H, Springer A, Rösen-Wolff A, Gelinsky M. 2010. Crosstalk of osteoblast and osteoclast precursors on mineralized collagen—towards an in vitro model for bone remodeling. *J Biomed Mater Res A* 95:848–856.

- Bernhardt A, Schumacher M, Gelinsky M. 2014. Formation of osteoclasts on calcium phosphate bone cements and polystyrene depends on monocyte isolation conditions. *Tissue Eng Part C Methods* 21:160–170.
- Bernhardt A, Wehrl M, Paul B, Hochmuth T, Schumacher M, Schütz K, Gelinsky M. 2015. Improved sterilization of sensitive biomaterials with supercritical carbon dioxide at low temperature. *PloS one* 10:e0129205.
- Biskobing D, Fan D. 2000. Acid ph increases carbonic anhydrase ii and calcitonin receptor mrna expression in mature osteoclasts. *Calcif. Tissue Int.* 67:178–183.
- Blair HC, Teitelbaum SL, Ghiselli R, Gluck S. 1989. Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science* 245:855–857.
- Blair HC. 1998. How the osteoclast degrades bone. *Bioessays* 20:837–846.
- Blottière HM, Daculsi G, Anegón I, Pouezat JA, Nelson PN, Passuti N. 1995. Utilization of activated u937 monocytic cells as a model to evaluate biocompatibility and biodegradation of synthetic calcium phosphate. *Biomaterials* 16:497–503.
- Boccaccini AR, Maquet V. 2003. Bioresorbable and bioactive polymer/bioglass® composites with tailored pore structure for tissue engineering applications. *Compos Sci Technol* 63:2417–2429.
- Bossard MJ, Tomaszek TA, Thompson SK, Amegadzie BY, Hanning CR, Jones C, Kurdyla JT, McNulty DE, Drake FH, Gowen M, Levy MA. 1996. Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin k. expression, purification, activation, and substrate identification. *J. Biol. Chem.* 271:12517–12524.
- Botelho C, Brooks RA, Kawai T, Ogata S, Ohtsuki C, Best S, Lopes M, Santos JD, Rushton N, Bonfield W. 2005. In vitro analysis of protein adhesion to phase pure hydroxyapatite and silicon substituted hydroxyapatite. *Key Eng Mater* 284:461–464.
- Botelho C, Brooks R, Spence G, McFarlane I, Lopes M, Best S, Santos J, Rushton N, Bonfield W. 2006. Differentiation of mononuclear precursors into osteoclasts on the surface of si-substituted hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res A* 78:709–720.
- Boyde A, Ali NN, Jones SJ. 1984. Resorption of dentine by isolated osteoclasts in vitro. *Br. Dent. J.* 156:216–220.
- Carano A, Schlesinger PH, Athanasou NA, Teitelbaum SL, Blair HC. 1993. Acid and base effects on avian osteoclast activity. *Am. J. Physiol.* 264:C694–C701.
- Chambers T, Thomson B, Fuller K. 1984. Effect of substrate composition on bone resorption by rabbit osteoclasts. *J. Cell Sci.* 70:61–71.
- Chambers T. 2010. The birth of the osteoclast. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1192:19–26.
- Cheng X, Hookway E, Kashima T, Oppermann U, Galione A, Athanasou N. 2015. The role of calcium and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (naadp) in human osteoclast formation and resorption. *Calcif. Tissue Int.* 96:73–79.

- Chim H, Schantz JT. 2005. New frontiers in calvarial reconstruction: integrating computer-assisted design and tissue engineering in cranioplasty. *Plast. Reconstr. Surg.* 116:1726–1741.
- Clemens JD, Herrick MV, Singer FR, Eyre DR. 1997. Evidence that serum ntx (collagen-type i n-telopeptides) can act as an immunochemical marker of bone resorption. *Clin. Chem.* 43:2058–2063.
- Cody JJ, Rivera AA, Liu J, Liu JM, Douglas JT, Feng X. 2011. A simplified method for the generation of human osteoclasts in vitro. *Int J Biochem Mol Biol* 2:183–189.
- Costa-Rodrigues J, Fernandes A, Fernandes M. 2011. Spontaneous and induced osteoclastogenic behaviour of human peripheral blood mononuclear cells and their cd14+ and cd14- cell fractions. *Cell Prolif.* 44:410–419.
- Costa-Rodrigues J, Fernandes A, Lopes MA, Fernandes MH. 2012. Hydroxyapatite surface roughness: complex modulation of the osteoclastogenesis of human precursor cells. *Acta Biomater.* 8:1137–1145.
- Davison NL, ten Harkel B, Schoenmaker T, Luo X, Yuan H, Everts V, Barrere-de Groot F, de Bruijn JD. 2014. Osteoclast resorption of beta-tricalcium phosphate controlled by surface architecture. *Biomaterials* 35:7441–7451.
- Delaissé JM, Andersen TL, Engsig MT, Henriksen K, Troen T, Blavier L. 2003. Matrix metalloproteinases (mmp) and cathepsin k contribute differently to osteoclastic activities. *Microsc. Res. Tech.* 61:504–513.
- Detsch R, Hagmeyer D, Neumann M, Schaefer S, Vortkamp A, Wuelling M, Ziegler G, Epple M. 2010a. The resorption of nanocrystalline calcium phosphates by osteoclast-like cells. *Acta Biomater.* 6:3223–3233.
- Detsch R, Schaefer S, Deisinger U, Ziegler G, Seitz H, Leukers B. 2010b. In vitro-osteoclastic activity studies on surfaces of 3d printed calcium phosphate scaffolds. *J. Biomater. Appl.* 26:359–380.
- Detsch R, Boccaccini AR. 2014. The role of osteoclasts in bone tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med* [Epub ahead of print] DOI: 10.1002/term.1851:in press.
- De Almeida MC, Silva A, Barral A, Netto MB. 2000. A simple method for human peripheral blood monocyte isolation. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95:221–224.
- DiCosmo-Ponticello CJ, Hoover D, Coffman FD, Cohen S, Cohen MC. 2014. Mif inhibits monocytic movement through a non-canonical receptor and disruption of temporal rho gtpase activities in u-937 cells. *Cytokine* 69:47–55.
- Dodds RA, James IE, Rieman D, Ahern R, Hwang SM, Connor JR, Thompson SD, Veber DF, Drake FH, Holmes S, Lark MW, Gowen M. 2001. Human osteoclast cathepsin k is processed intracellularly prior to attachment and bone resorption. *J. Bone Miner. Res.* 16:478–486.

- Domaschke H, Gelinsky M, Burmeister B, Fleig R, Hanke T, Reinstorf A, Pompe W, Rösen-Wolff A. 2006. In vitro ossification and remodeling of mineralized collagen i scaffolds. *Tissue Eng.* 12:949–958.
- Drake FH, Dodds RA, James IE, Connor JR, Debouck C, Richardson S, Lee-Rykaczewski E, Coleman L, Rieman D, Barthlow R, Hastings G, Gowen M. 1996. Cathepsin k, but not cathepsins b, l, or s, is abundantly expressed in human osteoclasts. *J. Biol. Chem.* 271:12511–12516.
- Drenckhahn D, Kugler P. 2002. Knochengewebe. In: Benninghoff A, Drenckhahn D (Hrsg): *Anatomie*. Bd 1, 16. Aufl. Urban & Fischer, München, S. 133-149.
- Drosse I, Volkmer E, Capanna R, Biase PD, Mutschler W, Schieker M. 2008. Tissue engineering for bone defect healing: an update on a multi-component approach. *Injury* 39:9–20.
- Ehrhart F. 2011. Untersuchungen zur Kryokonservierung und Einschlussimmobilisierung therapeutisch relevanter Zellsysteme. Universität des Saarlandes, Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät III, Dissertation.
- Ek-Rylander B, Bill P, Norgård M, Nilsson S, Andersson G. 1991. Cloning, sequence, and developmental expression of a type 5, tartrate-resistant, acid phosphatase of rat bone. *J. Biol. Chem.* 266:24684–24689.
- Faccio R, Grano M, Colucci S, Zallone AZ, Quaranta V, Pelletier A. 1998. Activation of $\alpha_v \beta_3$ integrin on human osteoclast-like cells stimulates adhesion and migration in response to osteopontin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249:522–525.
- Faller A, Schünke M, Schünke G, Taub E. 2004. Human body: an introduction to structure and function. Thieme, Stuttgart, S. 81.
- Fong D, Bisson M, Laberge G, McManus S, Grenier G, Faucheux N, Roux S. 2013. Bone morphogenetic protein-9 activates smad and erk pathways and supports human osteoclast function and survival in vitro. *Cell. Signal.* 25:717–728.
- Fuller K, Ross JL, Szewczyk KA, Moss R, Chambers TJ. 2010. Bone is not essential for osteoclast activation. *PLoS One* 5:e12837.
- Garnero P, Borel O, Byrjalsen I, Ferreras M, Drake FH, McQueney MS, Foged NT, Delmas PD, Delaissé JM. 1998. The collagenolytic activity of cathepsin k is unique among mammalian proteinases. *J. Biol. Chem.* 273:32347–32352.
- Gay CV, Mueller WJ. 1974. Carbonic anhydrase and osteoclasts: localization by labeled inhibitor autoradiography. *Science* 183:432–434.
- Geblinger D, Addadi L, Geiger B. 2010. Nano-topography sensing by osteoclasts. *J. Cell Sci.* 123:1503–1510.
- Gelb BD, Shi GP, Chapman HA, Desnick RJ. 1996. Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin k deficiency. *Science* 273:1236–1238.

- Gelinsky M, König U, Sewing A, Pompe W. 2004. Poröse scaffolds aus mineralisiertem kollagen - ein biomimetisches knochenersatzmaterial. *Mat-wiss. Werkstofftech.* 35:229–233.
- Glenske K, Wagner AS, Hanke T, Cavalcanti-Adam EA, Heinemann S, Heinemann C, Kruppke B, Arnhold S, Moritz A, Schwab EH *et al.* 2014. Bioactivity of xerogels as modulators of osteoclastogenesis mediated by connexin 43. *Biomaterials* 35:1487–1495.
- Goldhaber P, Rabadjija L. 1987. H⁺ stimulation of cell-mediated bone resorption in tissue culture. *Am. J. Physiol.* 253:E90–E98.
- Gomi K, Lowenberg B, Shapiro G, Davies J. 1993. Resorption of sintered synthetic hydroxyapatite by osteoclasts in vitro. *Biomaterials* 14:91–96.
- Gowen M, Lazner F, Dodds R, Kapadia R, Feild J, Tavaría M, Bertoncello I, Drake F, Zavarselk S, Tellis I, Hertzog P, Debouck C, Kola I. 1999. Cathepsin k knockout mice develop osteopetrosis due to a deficit in matrix degradation but not demineralization. *J. Bone Miner. Res.* 14:1654–1663.
- Grano M, Zigrino P, Colucci S, Zambonin G, Trusolino L, Serra M, Baldini N, Teti A, Marchisio PC, Zallone AZ. 1994. Adhesion properties and integrin expression of cultured human osteoclast-like cells. *Exp. Cell Res.* 212:209–218.
- Greenwald AS, Boden SD, Goldberg VM, Khan Y, Laurencin CT, Rosier RN. 2001. Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications. *J Bone Joint Surg* 83:98–103.
- Hall GE, Kenny AD. 1987. Role of carbonic anhydrase in bone resorption: effect of acetazolamide on basal and parathyroid hormone-induced bone metabolism. *Calcif. Tissue Int.* 40:212–218.
- Halleen JM, Räisänen S, Salo JJ, Reddy SV, Roodman GD, Hentunen TA, Lehenkari PP, Kaija H, Vihko P, Väänänen HK. 1999. Intracellular fragmentation of bone resorption products by reactive oxygen species generated by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. *J. Biol. Chem.* 274:22907–22910.
- Halleen JM, Alatalo SL, Suominen H, Cheng S, Janckila AJ, Väänänen HK. 2000. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b: a novel serum marker of bone resorption. *J. Bone Miner. Res.* 15:1337–1345.
- Halleen JM, Ylipahkala H, Alatalo SL, Janckila AJ, Heikkinen JE, Suominen H, Cheng S, Väänänen HK. 2002. Serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b, but not 5a, correlates with other markers of bone turnover and bone mineral density. *Calcif. Tissue Int.* 71:20–25.
- Hattersley G, Chambers T. 1989. Generation of osteoclastic function in mouse bone marrow cultures: multinuclearity and tartrate-resistant acid phosphatase are unreliable markers for osteoclastic differentiation. *Endocrinology* 124:1689–1696.
- Heinemann S, Gelinsky M, Worch H, Hanke T. 2011. Resorbierbare knochenersatzmaterialien. *Der Orthopäde* 40:761–773.
- Henriksen K, Gram J, Schaller S, Dahl BH, Dziegiel MH, Bollerslev J, Karsdal MA. 2004. Characterization of osteoclasts from patients harboring a g215r mutation in *clc-7* causing autosomal dominant osteopetrosis type ii. *Am J Pathol* 164:1537–1545.

- Herrmann M, Schmidt J, Umanskaya N, Colaianni G, Al Marrawi F, Widmann T, Zallone A, Wildemann B, Herrmann W. 2007. Stimulation of osteoclast activity by low b-vitamin concentrations. *Bone* 41:584–591.
- Hoebertz A, Arnett TR. 2003. Isolated osteoclast cultures. In: *Bone Research Protocols* Springer, pp. 53–64.
- Hutmacher DW. 2000. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 21:2529–2543.
- Janckila AJ, Takahashi K, Sun SZ, Yam LT. 2001. Naphthol-asbi phosphate as a preferred substrate for tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b. *J. Bone Miner. Res.* 16:788–793.
- John A, Varma H, Vijayan S, Bernhardt A, Lode A, Vogel A, Burmeister B, Hanke T, Domaschke H, Gelinsky M. 2009. In vitro investigations of bone remodeling on a transparent hydroxyapatite ceramic. *Biomed Mater* 4:015007.
- Johnson Jr WD, Mei B, Cohn ZA. 1977. The separation, long-term cultivation, and maturation of the human monocyte. *J. exp. Med* 146:1613–1626.
- Jones SJ, Boyde A, Ali NN. 1984. The resorption of biological and non-biological substrates by cultured avian and mammalian osteoclasts. *Anat. Embryol. (Berl.)* 170:247–256.
- Kakudo S, Miyazawa K, Kameda T, Mano H, Mori Y, Yuasa T, Nakamaru Y, Shiokawa M, Nagahira K, Tokunaga S, Hakeda Y, Kumegawa M. 1996. Isolation of highly enriched rabbit osteoclasts from collagen gels: a new assay system for bone-resorbing activity of mature osteoclasts. *J. Bone Miner. Metab.* 14:129–136.
- Karsdal MA, Hjorth P, Henriksen K, Kirkegaard T, Nielsen KL, Lou H, Delaissé JM, Foged NT. 2003. Transforming growth factor- β controls human osteoclastogenesis through the p38 mapk and regulation of rank expression. *J. Biol. Chem.* 278:44975–44987.
- Karst M, Gorny G, Galvin RJS, Oursler MJ. 2004. Roles of stromal cell rankl, opg, and m-csf expression in biphasic tgfb- β regulation of osteoclast differentiation. *J. Cell. Physiol.* 200:99–106.
- Keller J, Brink S, Busse B, Schilling AF, Schinke T, Amling M, Lange T. 2012. Divergent resorbability and effects on osteoclast formation of commonly used bone substitutes in a human in vitro-assay. *PloS one* 7:e46757.
- Kenny AD. 1985. Role of carbonic anhydrase in bone: partial inhibition of disuse atrophy of bone by parenteral acetazolamide. *Calcif. Tissue Int.* 37:126–133.
- Kirstein B, Chambers TJ, Fuller K. 2006. Secretion of tartrate-resistant acid phosphatase by osteoclasts correlates with resorptive behavior. *J. Cell. Biochem.* 98:1085–1094.
- Kiviranta R, Morko J, Uusitalo H, Aro HT, Vuorio E, Rantakokko J. 2001. Accelerated turnover of metaphyseal trabecular bone in mice overexpressing cathepsin k. *J. Bone Miner. Res.* 16:1444–1452.

- Kiviranta R, Morko J, Alatalo SL, NicAmhlaoibh R, Risteli J, Laitala-Leinonen T, Vuorio E. 2005. Impaired bone resorption in cathepsin k-deficient mice is partially compensated for by enhanced osteoclastogenesis and increased expression of other proteases via an increased rankl/opg ratio. *Bone* 36:159–172.
- Koller CA, King GW, Hurtubise PE, Sagone AL, LoBuglio AF. 1973. Characterization of glass adherent human mononuclear cells. *J. Immunol.* 111:1610–1612.
- Komano Y, Nanki T, Hayashida K, Taniguchi K, Miyasaka N. 2006. Identification of a human peripheral blood monocyte subset that differentiates into osteoclasts. *Arthritis Res Ther* 8:R152.
- Kreja L, Liedert A, Schmidt C, Claes L, Ignatius A. 2007. Influence of receptor activator of nuclear factor (nf)- κ b ligand (rankl), macrophage-colony stimulating factor (m-csf) and fetal calf serum on human osteoclast formation and activity. *J. Mol. Histol.* 38:341–345.
- Kumagai K, Itoh K, Hinuma S, Tada M. 1979. Pretreatment of plastic petri dishes with fetal calf serum. a simple method for macrophage isolation. *J. Immunol. Methods* 29:17–25.
- Kumaratilake L, Ferrante A. 1988. Purification of human monocytes/macrophages by adherence to cytodex microcarriers. *J. Immunol. Methods* 112:183–190.
- von Kölliker A. 1873. Die normale Resorption des Knochengewebes und ihre Bedeutung für die Entstehung der typischen Knochenformen. FCW Vogel.
- Langer RuVJP. 1993. Tissue engeneering. *Science* 260:920–926.
- Lark MW, Stroup G, James I, Dodds R, Hwang S, Blake S, Lechowska B, Hoffman S, Smith B, Kapadia R *et al.*. 2002. A potent small molecule, nonpeptide inhibitor of cathepsin k (sb 331750) prevents bone matrix resorption in the ovariectomized rat. *Bone* 30:746–753.
- Lau K, Onishi T, Wergedal J, Singer F, Baylink D. 1987. Characterization and assay of tartrate-resistant acid phosphatase activity in serum: potential use to assess bone resorption. *Clin. Chem.* 33:458–462.
- Lecaille F, Weidauer E, Juliano M, Bromme D, Lalmanach G. 2003. Probing cathepsin k activity with a selective substrate spanning its active site. *Biochem. J* 375:307–312.
- Lees R, Sabharwal V, Heersche J. 2001. Resorptive state and cell size influence intracellular ph regulation in rabbit osteoclasts cultured on collagen-hydroxyapatite films. *Bone* 28:187–194.
- Lehenkari P, Hentunen TA, Laitala-Leinonen T, Tuukkanen J, V  n  nen HK. 1998. Carbonic anhydrase ii plays a major role in osteoclast differentiation and bone resorption by effecting the steady state intracellular ph and ca^{2+} . *Exp. Cell Res.* 242:128–137.
- Littlewood-Evans A, Kokubo T, Ishibashi O, Inaoka T, Wlodarski B, Gallagher JA, Bilbe G. 1997. Localization of cathepsin k in human osteoclasts by in situ hybridization and immunohistochemistry. *Bone* 20:81–86.

- Ljusberg J, Wang Y, Lång P, Norgård M, Dodds R, Hultenby K, Ek-Rylander B, Andersson G. 2005. Proteolytic excision of a repressive loop domain in tartrate-resistant acid phosphatase by cathepsin k in osteoclasts. *J. Biol. Chem.* 280:28370–28381.
- Lutter AH, Hempel U, Wolf-Brandstetter C, Garbe AI, Goettsch C, Hofbauer LC, Jessberger R, Dieter P. 2010. A novel resorption assay for osteoclast functionality based on an osteoblast-derived native extracellular matrix. *J. Cell. Biochem.* 109:1025–1032.
- Marchisio M, Di Carmine M, Pagone R, Piattelli A, Miscia S. 2005. Implant surface roughness influences osteoclast proliferation and differentiation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 75:251–256.
- Matsunaga T, Inoue H, Kojo T, Hatano K, Tsujisawa T, Uchiyama C, Uchida Y. 1999. Disaggregated osteoclasts increase in resorption activity in response to roughness of bone surface. *J. Biomed. Mater. Res.* 48:417–423.
- McQueney MS, Amegadzie BY, D'Alessio K, Hanning CR, McLaughlin MM, McNulty D, Carr SA, Ijames C, Kurdyla J, Jones CS. 1997. Autocatalytic activation of human cathepsin k. *J. Biol. Chem.* 272:13955–13960.
- Meier C, Meinhardt U, Greenfield JR, De Winter J, Nguyen TV, Dunstan CR, Seibel MJ. 2005. Serum cathepsin k concentrations reflect osteoclastic activity in women with postmenopausal osteoporosis and patients with paget's disease. *Clin. Lab.* 52:1–10.
- Miller SC. 1985. The rapid appearance of acid phosphatase activity at the developing ruffled border of parathyroid hormone activated medullary bone osteoclasts. *Calcif. Tissue Int.* 37:526–529.
- Minkin C. 1982. Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif. Tissue Int.* 34:285–290.
- Monchau F, Lefevre A, Descamps M, Belquin-Myrdycz A, Laffargue P, Hildebrand H. 2002. In vitro studies of human and rat osteoclast activity on hydroxyapatite, β -tricalcium phosphate, calcium carbonate. *Biomol. Eng.* 19:143–152.
- Mulari M, Vääräniemi J, Väänänen HK. 2003. Intracellular membrane trafficking in bone resorbing osteoclasts. *Microsc. Res. Tech.* 61:496–503.
- Murrills RJ, Stein LS, Dempster DW. 1993. Stimulation of bone resorption and osteoclast clear zone formation by low ph: a time-course study. *J. Cell. Physiol.* 154:511–518.
- Nakanishi M, Yoh K, Miura T, Ohasi T, Rai SK, Uchida K. 2000. Development of a kinetic assay for band 5b tartrate-resistant acid phosphatase activity in serum. *Clin. Chem.* 46:469–473.
- Navarro M, Michiardi A, Castano O, Planell J. 2008. Biomaterials in orthopaedics. *J R Soc Interface* 5:1137–1158.
- Negishi-Koga T, Takayanagi H. 2009. Ca²⁺-nfatc1 signaling is an essential axis of osteoclast differentiation. *Immunol. Rev.* 231:241–256.

- Nerem RM, Sambanis A. 1995. Tissue engineering: from biology to biological substitutes. *Tissue Eng.* 1:3–13.
- Neutzsky-Wulff AV, Sørensen MG, Kocijancic D, Leeming DJ, Dziegiel MH, Karsdal MA, Henriksen K. 2010. Alterations in osteoclast function and phenotype induced by different inhibitors of bone resorption-implications for osteoclast quality. *BMC Musculoskelet Disord* 11:109.
- Nicholson GC, Malakellis M, Collier FM, Cameron PU, Holloway WR, Gough TJ, Gregorio-King C, Kirkland MA, Myers DE. 2000. Induction of osteoclasts from cd14-positive human peripheral blood mononuclear cells by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (rankl). *Clin. Sci.* 99:133–140.
- Nordström T, Shrode LD, Rotstein OD, Romanek R, Goto T, Heersche JN, Manolson MF, Brisseau GF, Grinstein S. 1997. Chronic extracellular acidosis induces plasmalemmal vacuolar type h+ atpase activity in osteoclasts. *J. Biol. Chem.* 272:6354–6360.
- Novinec M, Lenarčič B. 2013. Cathepsin k: a unique collagenolytic cysteine peptidase. *Biol. Chem.* 394:1163–1179.
- Onoda S, Sakuraba M, Asano T, Miyamoto S, Beppu Y, Chuman H, Kawai A, Nakatani F, Kimata Y. 2011. Use of vascularized free fibular head grafts for upper limb oncologic reconstruction. *Plast. Reconstr. Surg.* 127:1244–1253.
- Orcel P, Bielakoff J, De Vernejoul MC. 1990. Formation of multinucleated cells with osteoclast precursor features in human cord monocytes cultures. *Anat Rec* 226:1–9.
- Parikh S. 2002. Bone graft substitutes: past, present, future. *J. Postgrad. Med.* 48:142.
- Pfaff M, Jurdic P. 2001. Podosomes in osteoclast-like cells structural analysis and cooperative roles of paxillin, proline-rich tyrosine kinase 2 (pyk2) and integrin $\alpha v \beta 3$. *J. Cell Sci.* 114:2775–2786.
- Quinn J, Neale S, Fujikawa Y, McGee J, Athanasou N. 1998. Human osteoclast formation from blood monocytes, peritoneal macrophages, and bone marrow cells. *Calcif. Tissue Int.* 62:527–531.
- Razzouk S, Lieberherr M, Cournot G. 1999. Rac-gtpase, osteoclast cytoskeleton and bone resorption. *Eur. J. Cell Biol.* 78:249–255.
- Redey S, Razzouk S, Rey C, Bernache-Assollant D, Leroy G, Nardin M, Cournot G. 1999. Osteoclast adhesion and activity on synthetic hydroxyapatite, carbonated hydroxyapatite, and natural calcium carbonate: relationship to surface energies. *J. Biomed. Mater. Res.* 45:140–147.
- Reichert C, Götz W, Reimann S, Keilig L, Hagner M, Bourauel C, Jäger A. 2013. Resorption behavior of a nanostructured bone substitute: in vitro investigation and clinical application. *J Orolfac Orthop* 74:165–175.
- Reid SA. 1986. Effect of mineral content of human bone on in vitro resorption. *Anat. Embryol. (Berl.)* 174:225–234.
- Roodman GD, Windle JJ. 2005. Paget disease of bone. *J. Clin. Invest.* 115:200–208.

- Rosen H, Moses A, Garber J, Iloputaife I, Ross D, Lee S, Greenspan S. 2000. Serum ctx: a new marker of bone resorption that shows treatment effect more often than other markers because of low coefficient of variability and large changes with bisphosphonate therapy. *Calcif. Tissue Int.* 66:100–103.
- Ross MH, Pawlina W. 2003. *Histology – a text and atlas.* 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, S.190f.
- Ross FP, Christiano AM. 2006. Nothing but skin and bone. *J Clin Invest* 116:1140–1149.
- Rumpler M, Würger T, Roschger P, Zwettler E, Peterlik H, Fratzl P, Klaushofer K. 2012. Microcracks and osteoclast resorption activity in vitro. *Calcif. Tissue Int.* 90:230–238.
- Rumpler M, Würger T, Roschger P, Zwettler E, Sturmlechner I, Altmann P, Fratzl P, Rogers M, Klaushofer K. 2013. Osteoclasts on bone and dentin in vitro: mechanism of trail formation and comparison of resorption behavior. *Calcif. Tissue Int.* 93:526–539.
- Ruoslahti E, Öbrink B. 1996. Common principles in cell adhesion. *Exp. Cell Res.* 227:1–11.
- Saftig P, Hunziker E, Wehmeyer O, Jones S, Boyde A, Rommerskirch W, Moritz JD, Schu P, Von Figura K. 1998. Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-k-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13453–13458.
- Sakai H, Moriura Y, Notomi T, Kawawaki J, Ohnishi K, Kuno M. 2010. Phospholipase c-dependent ca^{2+} -sensing pathways leading to endocytosis and inhibition of the plasma membrane vacuolar h^{+} -atpase in osteoclasts. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 299:C570–C578.
- Salo J, Metsikko K, Palokangas H, Lehenkari P, Vaananen H. 1996. Bone-resorbing osteoclasts reveal a dynamic division of basal plasma membrane into two different domains. *J. Cell Sci.* 109:301–307.
- Salo J, Lehenkari P, Mulari M, Metsikkö K, Väänänen HK. 1997. Removal of osteoclast bone resorption products by transcytosis. *Science* 276:270–273.
- Saltel F, Destaing O, Bard F, Eichert D, Jurdic P. 2004. Apatite-mediated actin dynamics in resorbing osteoclasts. *Mol. Biol. Cell* 15:5231–5241.
- Scheven BA, Milne JS, Robins SP. 1997. A novel culture system to generate osteoclasts and bone resorption using porcine bone marrow cells: role of m-csf. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231:231–235.
- Schilling AF, Linhart W, Filke S, Gebauer M, Schinke T, Rueger JM, Amling M. 2004. Resorbability of bone substitute biomaterials by human osteoclasts. *Biomaterials* 25:3963–3972.
- Sen M, Miclau T. 2007. Autologous iliac crest bone graft: should it still be the gold standard for treating nonunions? *Injury* 38:75–80.
- Shafieyan Y, Tiedemann K, Goulet A, Komarova S, Quinn TM. 2012. Monocyte proliferation and differentiation to osteoclasts is affected by density of collagen covalently bound to a poly (dimethyl siloxane) culture surface. *J Biomed Mater Res A* 100:1573–1581.

- Shalhoub V, Elliott G, Chiu L, Manoukian R, Kelley M, Hawkins N, Davy E, Shimamoto G, Beck J, Kaufman S, Van G, Scully S, Qi M, Grisanti M, Dunstan C, Boyle W, Lacey D. 2000. Characterization of osteoclast precursors in human blood. *Br. J. Haematol.* 111:501–512.
- Shaw R, Doherty D, Ritter A, Benedict S, Clark R. 1990. Adherence-dependent increase in human monocyte pdgf (b) mrna is associated with increases in c-fos, c-jun, and egr2 mrna. *J Cell Biol* 111:2139–2148.
- Shibutani T, Heersche JN. 1993. Effect of medium ph on osteoclast activity and osteoclast formation in cultures of dispersed rabbit osteoclasts. *J. Bone Miner. Res.* 8:331–336.
- Silver I, Murrills R, Etherington D. 1988. Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. *Exp. Cell Res.* 175:266–276.
- Silverton SF, Dodgson SJ, Fallon MD, Forster R. 1987. Carbonic anhydrase activity of chick osteoclasts is increased by parathyroid hormone. *Am. J. Physiol.* 253:E670–E674.
- Sly WS, Hewett-Emmett D, Whyte MP, Yu YS, Tashian RE. 1983. Carbonic anhydrase ii deficiency identified as the primary defect in the autosomal recessive syndrome of osteopetrosis with renal tubular acidosis and cerebral calcification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:2752–2756.
- Stock UA, Vacanti JP. 2001. Tissue engineering: current state and prospects. *Annu. Rev. Med.* 52:443–451.
- Stoddart MJ, Richards RG, Alini M. 2012. In vitro experiments with primary mammalian cells: to pool or not to pool? *Eur. Cell. Mater.* 24:i–ii.
- Stroup GB, Lark MW, Veber DF, Bhattacharyya A, Blake S, Dare LC, Erhard KF, Hoffman SJ, James IE, Marquis RW, Ru Y, Vasko-Moser JA, Smith BR, Tomaszek T, Gowen M. 2001. Potent and selective inhibition of human cathepsin k leads to inhibition of bone resorption in vivo in a nonhuman primate. *J. Bone Miner. Res.* 16:1739–1746.
- Sun S, Karsdal MA, Bay-Jensen AC, Sørensen MG, Zheng Q, Dziegiel MH, Maksymowych WP, Henriksen K. 2013. The development and characterization of an elisa specifically detecting the active form of cathepsin k. *Clin. Biochem.* 46:1601–1606.
- Susa M, Luong-Nguyen NH, Cappellen D, Zamurovic N, Gamse R. 2004. Human primary osteoclasts: in vitro generation and applications as pharmacological and clinical assay. *J Transl Med* 2:6.
- Söderström M, Salminen H, Glumoff V, Kirschke H, Aro H, Vuorio E. 1999. Cathepsin expression during skeletal development. *Biochim. Biophys. Acta* 1446:35–46.
- Teitelbaum SL. 2000a. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289:1504–1508.
- Teitelbaum SL. 2000b. Osteoclasts, integrins, and osteoporosis. *J. Bone Miner. Metab.* 18:344–349.
- Teti A, Blair H, Schlesinger P, Grano M, Zamboni-Zallone A, Kahn A, Teitelbaum S, Hruska K. 1989. Extracellular protons acidify osteoclasts, reduce cytosolic calcium, and promote expression of cell-matrix attachment structures. *J. Clin. Invest.* 84:773.

- Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, Tanaka H, Sasaki T, Nishihara T, Koga T, Martin TJ, Suda T. 1990. Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:7260–7264.
- Vaananen H, Zhao H, Mulari M, Halleen JM. 2000. The cell biology of osteoclast function. *J. Cell Sci.* 113:377–381.
- Vignery A. 2000. Osteoclasts and giant cells: macrophage-macrophage fusion mechanism. *Int. J. Exp. Pathol.* 81:291–304.
- Votta BJ, Levy MA, Badger A, Bradbeer J, Dodds RA, James IE, Thompson S, Bossard MJ, Carr T, Connor JR, Tomaszek TA, Szewczuk L, Drake FH, Veber DF, Gowen M. 1997. Peptide aldehyde inhibitors of cathepsin k inhibit bone resorption both in vitro and in vivo. *J. Bone Miner. Res.* 12:1396–1406.
- Väänänen H, Karhukorpi E, Sundquist K, Wallmark B, Roininen I, Hentunen T, Tuukkanen J, Lakka-korpi P. 1990. Evidence for the presence of a proton pump of the vacuolar h (+)-atpase type in the ruffled borders of osteoclasts. *J Cell Biol* 111:1305–1311.
- Väänänen K. 2005. Mechanism of osteoclast mediated bone resorption—rationale for the design of new therapeutics. *Adv. Drug Delivery Rev.* 57:959–971.
- Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Siegel RW, Bizios R. 2001. Enhanced osteoclast-like cell functions on nanophase ceramics. *Biomaterials* 22:1327–1333.
- Wei S, Teitelbaum SL, Wang MW, Ross FP. 2001. Receptor activator of nuclear factor-kappa b ligand activates nuclear factor-kappa b in osteoclast precursors. *Endocrinology* 142:1290–1295.
- Wennerberg A, Albrektsson T. 2009. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clin. Oral Implants Res.* 20:172–184.
- Wilson A, Trumpp A. 2006. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat. Rev. Immunol.* 6:93–106.
- Wu L, Luthringer BJ, Feyerabend F, Schilling AF, Willumeit R. 2014. Effects of extracellular magnesium on the differentiation and function of human osteoclasts. *Acta Biomater.* 10:2843–2854.
- Zaidi M. 2007. Skeletal remodeling in health and disease. *Nat. Med.* 13:791–801.
- Zhang Z, Egaña JT, Reckhenrich AK, Schenck TL, Lohmeyer JA, Schantz JT, Machens HG, Schilling AF. 2012. Cell-based resorption assays for bone graft substitutes. *Acta Biomater.* 8:13–19.
- Zimolo Z, Wesolowski G, Rodan GA. 1995. Acid extrusion is induced by osteoclast attachment to bone. inhibition by alendronate and calcitonin. *J. Clin. Invest.* 96:2277.
- Štěpán JJ, Pospíchal J, Schreiber V, Kaňka J, Menšík J, Presl J, Pacovský V. 1989. The application of plasma tartrate-resistant acid phosphatase to assess changes in bone resorption in response to artificial menopause and its treatment with estrogen or norethisterone. *Calcif. Tissue Int.* 45:273–280.

A. Danksagung

Für die Möglichkeit meine medizinische Doktorarbeit am Zentrum für Translationale Knochen-, Gelenk- und Weichgewebeforschung zu bearbeiten möchte ich mich als erstes bei Prof. Dr. rer. nat. Michael Gelinsky bedanken. Ich danke zudem Frau Prof. Dr. med. Angela Rösen-Wolff für die Erstellung des zweiten Gutachtens für diese Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. Anne Bernhardt. Anne, ich danke dir für dein immer offenes Ohr, für deine Kreativität, deine Hilfsbereitschaft in allen Momenten und deine motivierenden Worte. Außerdem danke ich dir für deine zahlreichen Hinweise und Anmerkungen zur Verbesserung dieser Arbeit.

Ich danke Ortrud Zieschang für die Herstellung der Tapes und ihre immer hilfsbereite Art, Kathleen Schütz für die Hilfe bei der Herstellung der Alginatgele und Matthias Schumacher für die Unterstützung bei der TRAP-Färbung.

Auch bei Sophie Brüggemeier möchte ich mich herzlich bedanken.

Des Weiteren danke ich Mohamed Shosha für das Zusägen der Knochenzylinder sowie Diana Jünger für das schneiden der *bone chips*.

Und was wäre stundenlange Laborarbeit, komplizierte Experimente und lange Nachmittage am Mikroskop ohne Pausen? Ich danke allen Mitarbeitern des TFO für die schönen gemeinsam verbrachten Momente und ihre Freundlichkeit, mit der ich von Anfang an aufgenommen wurde. Tilman Ahlfeld möchte ich ganz besonders für die Unterstützung im Umgang mit dem Programm LaTeX danken. Danke für deine Geduld mit mir, ohne dich hätte ich wahrscheinlich noch zwei Jahre länger gebraucht.

And of course, doing experiments all day, sitting in the cell culture lab or measuring biochemistry is frustrating as well sometimes. For that, having friends on your side is the best motivation. Thank you Rahul for everything.

Abschließend möchte ich mich noch bei denen bedanken, die mir, egal was kommt, immer unterstützend zur Seite stehen. Danke Sören, danke meinen lieben Eltern und danke Theres. Ganz besonders gilt mein Dank meinen Eltern, die mich in meinen Entscheidungen immer unterstützen, mich beraten und für mich da sind.

B. Erklärungen zur Eröffnung des Promotionsverfahrens

Technische Universität Dresden
Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus
Promotionsordnung vom 24. Juli 2011

1. Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.
2. Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:
Dr. Anne Bernhardt
3. Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.
4. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.
5. Die Inhalte dieser Dissertation wurden in folgender Form veröffentlicht: *entfällt*
6. Ich bestätige, dass es keine zurückliegenden erfolglosen Promotionsverfahren gab.
7. Ich bestätige, dass ich die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität Dresden anerkenne.
8. Ich habe die Zitierrichtlinien für Dissertationen an der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität Dresden zur Kenntnis genommen und befolgt.

Dresden, 14. Juli 2016

Kathleen Koperski

C. Bestätigung zur Einhaltung gesetzlicher Vorgaben

Hiermit bestätige ich die Einhaltung der folgenden aktuellen gesetzlichen Vorgaben im Rahmen meiner Dissertation

- ☐ das zustimmende Votum der Ethikkommission bei Klinischen Studien, epidemiologischen Untersuchungen mit Personenbezug oder Sachverhalten, die das Medizinproduktegesetz betreffen
EK 91032012 – Entwicklung biologischer Knochenersatzmaterialien, ausgestellt für Dr. Maik Stiehler
- ☐ die Einhaltung der Bestimmungen des Tierschutzgesetzes
entfällt
- ☐ die Einhaltung des Gentechnikgesetzes
entfällt
- ☐ die Einhaltung von Datenschutzbestimmungen der Medizinischen Fakultät und des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus.

Dresden, 14. Juli 2016

Kathleen Koperski

D. Anhang

D1. Einfluss des pH-Wertes auf die Osteoklastogenese

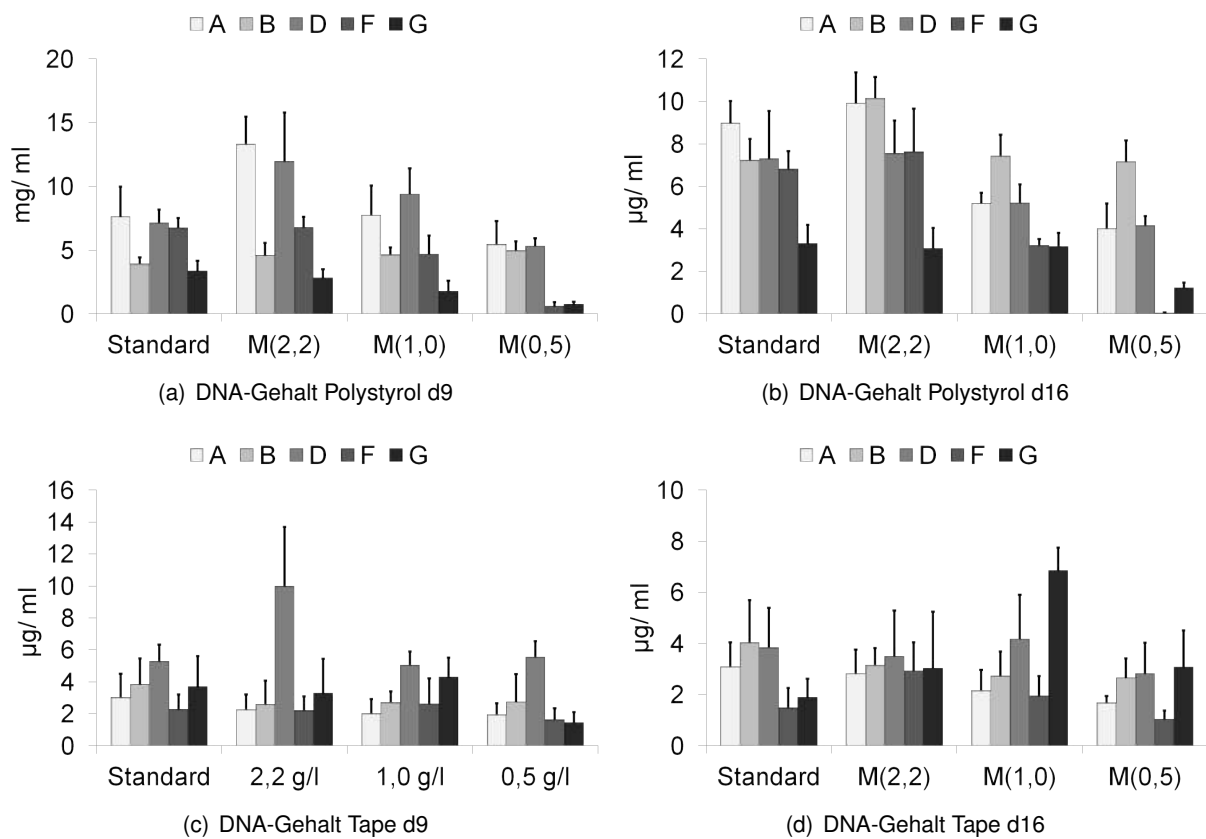


Abbildung D.1.: DNA-Gehalt der Spender A, B, D, F und G mit je $n_x=5$, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler zum Zeitpunkt d9 (a,c) und d16 (b, d).

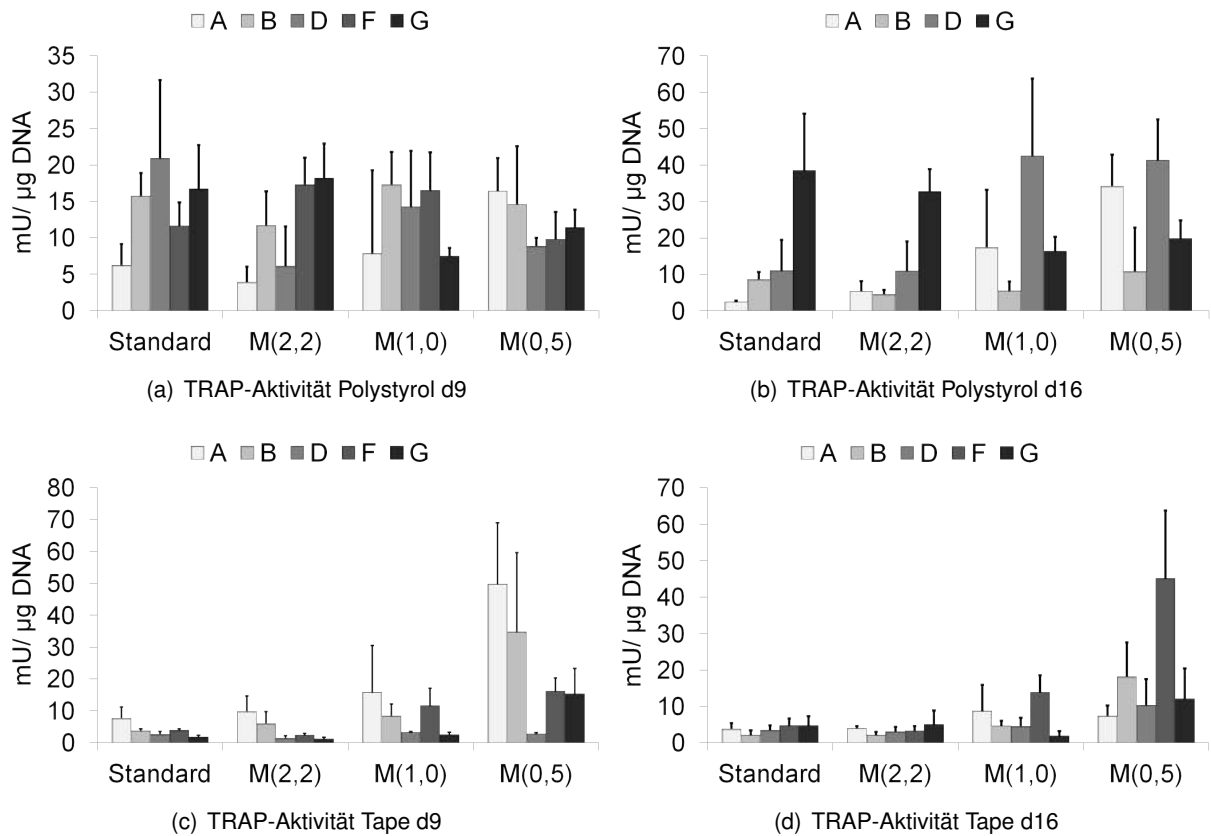


Abbildung D.2.: TRAP-Aktivität der Spender A, B, D, F und G mit je $n_x=5$, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler zum Zeitpunkt d9 (a,c) und d16 (b, d).

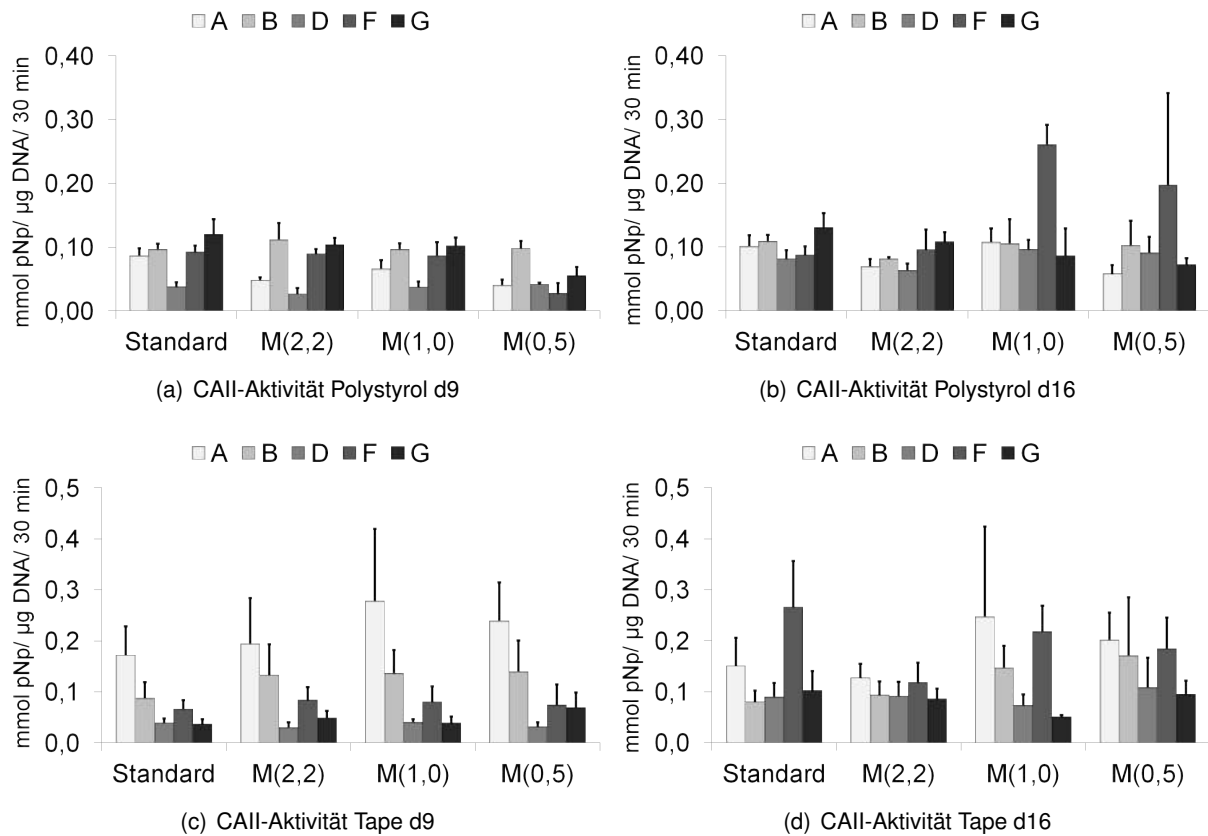


Abbildung D.3.: CAII-Aktivität der Spender A, B, D, F und G mit je $n_x=5$, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler zum Zeitpunkt d9 (a,c) und d16 (b, d).

D2. Einfluss des Kultivierungsmediums auf die Osteoklastogenese

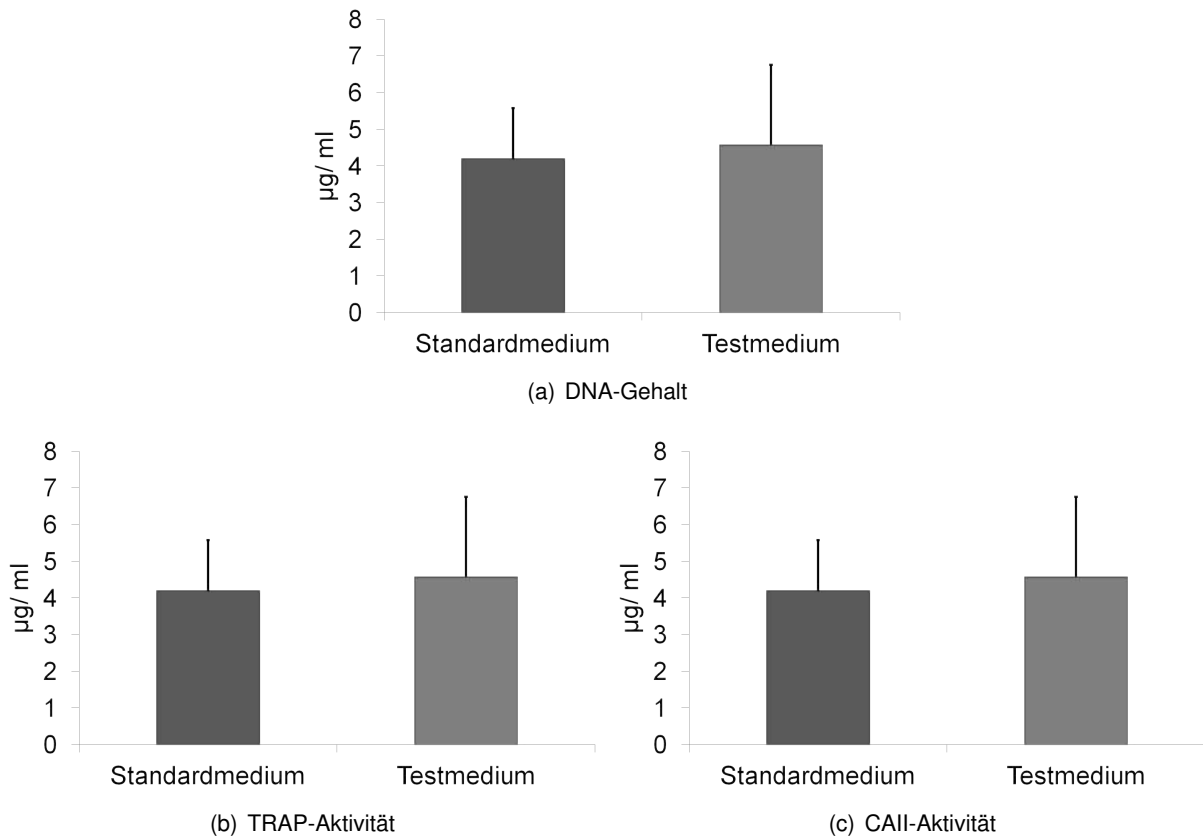


Abbildung D.4.: DNA-Gehalt (a), TRAP-Aktivität (b) sowie CAII-Aktivität (c) osteoklastärer Zellen auf mineralisiertem Kollagentape, Daten von Spender C, F und I (je $n_x=5$) mit $n=15$, Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung nach 16 Tagen Kultivierung unter M-CSF und RANKL. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Messdaten der mit Standardmedium kultivierten und der mit Testmedium kultivierten Proben festgestellt werden.

D3. Osteoklastogenese auf anderen Biomaterialien

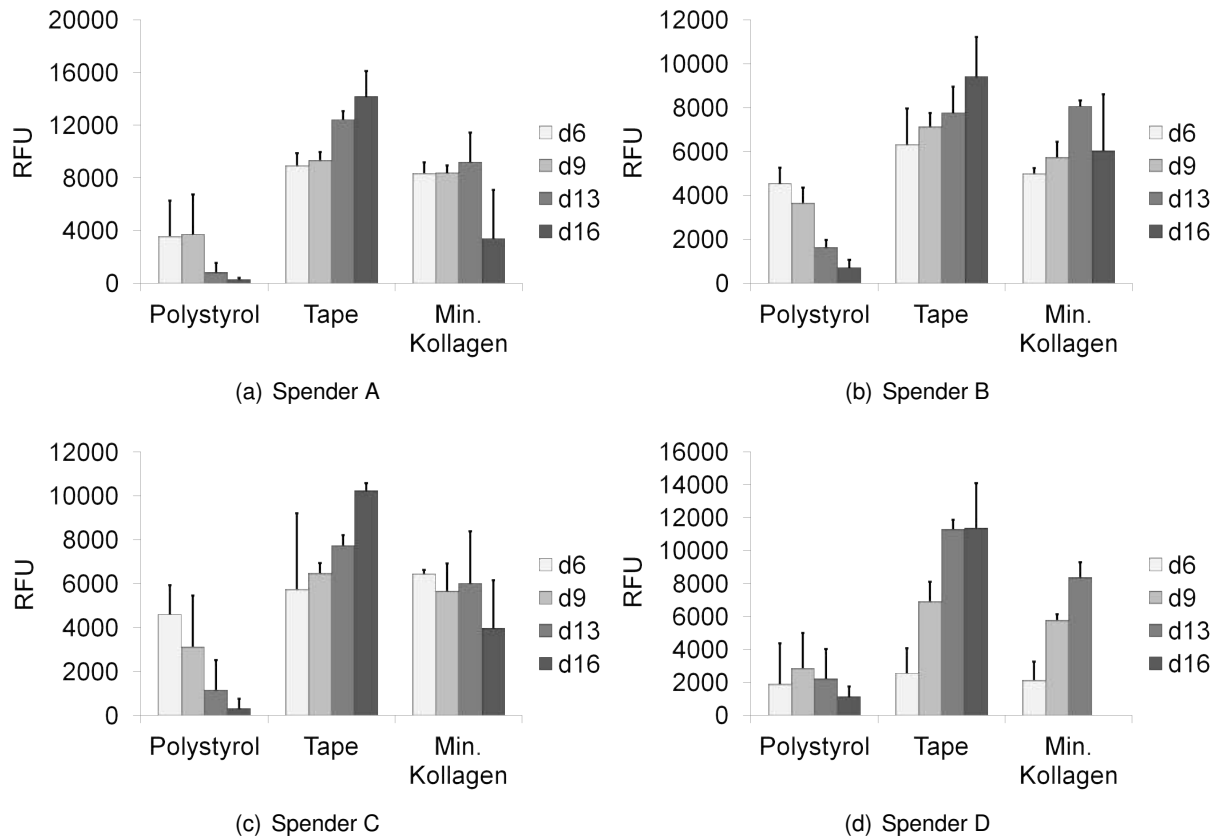


Abbildung D.5.: Osteoklastogenese von PBMC unter M-CSF und RANKL auf Polystyrol, Tape und mineralisierter Kollagenmatrix. Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichungen der Kathepsin K-Aktivitäten von Spender A, B, C und D mit jeweils n=5 für jeden Zeitpunkt (Ausnahme: keine Messwerte für Spender D, mineralisierte Kollagenmatrix, d16).

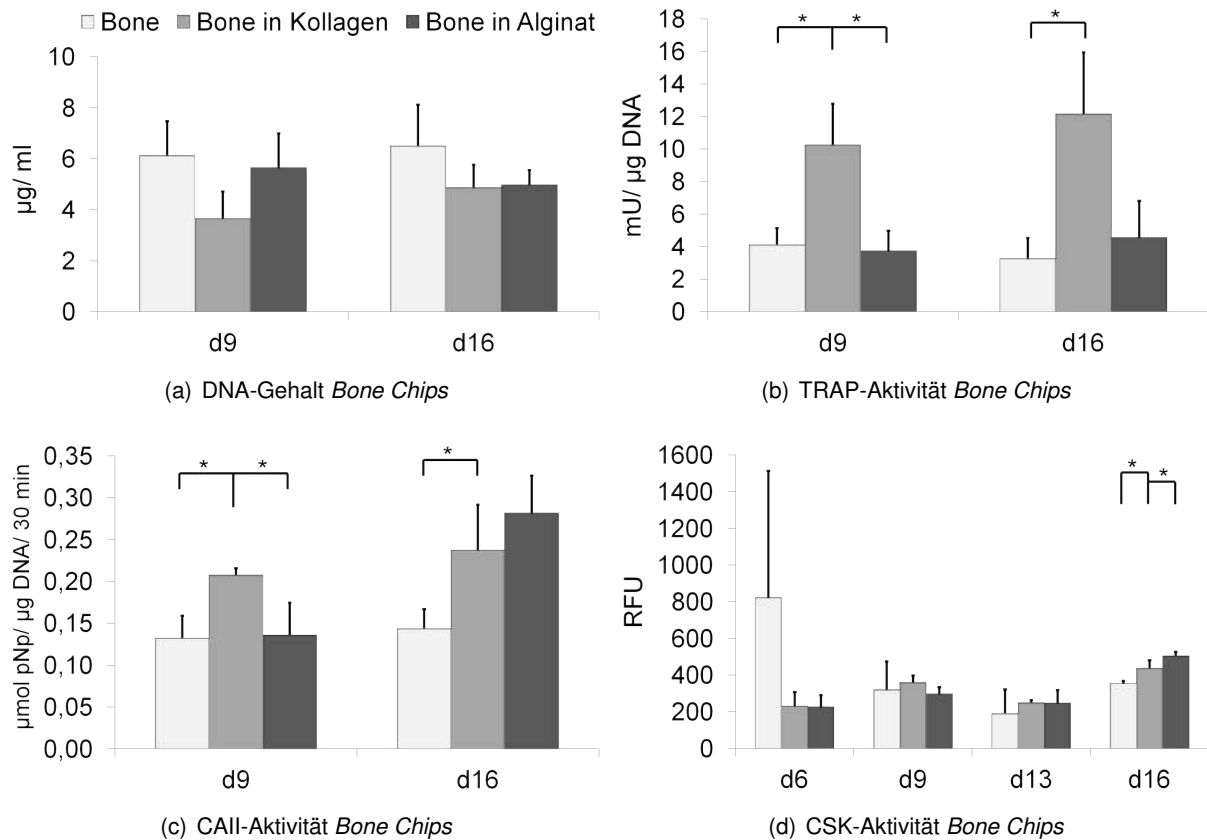


Abbildung D.6.: Osteoklastogenese von PBMC (Spender A) unter M-CSF und RANKL auf *bone chips*, *bone chips* in Kollagengel und *bone chips* in Alginatgel. Besiedlungszellzahl auf *bone chips* 4×10^6 Zellen, auf *bone chips* in Kollagen sowie in Alginat jeweils 6×10^5 Zellen. Messdaten von Spender A, d9 jeweils n=3, d16 jeweils n=4, Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen, * p<0,05.

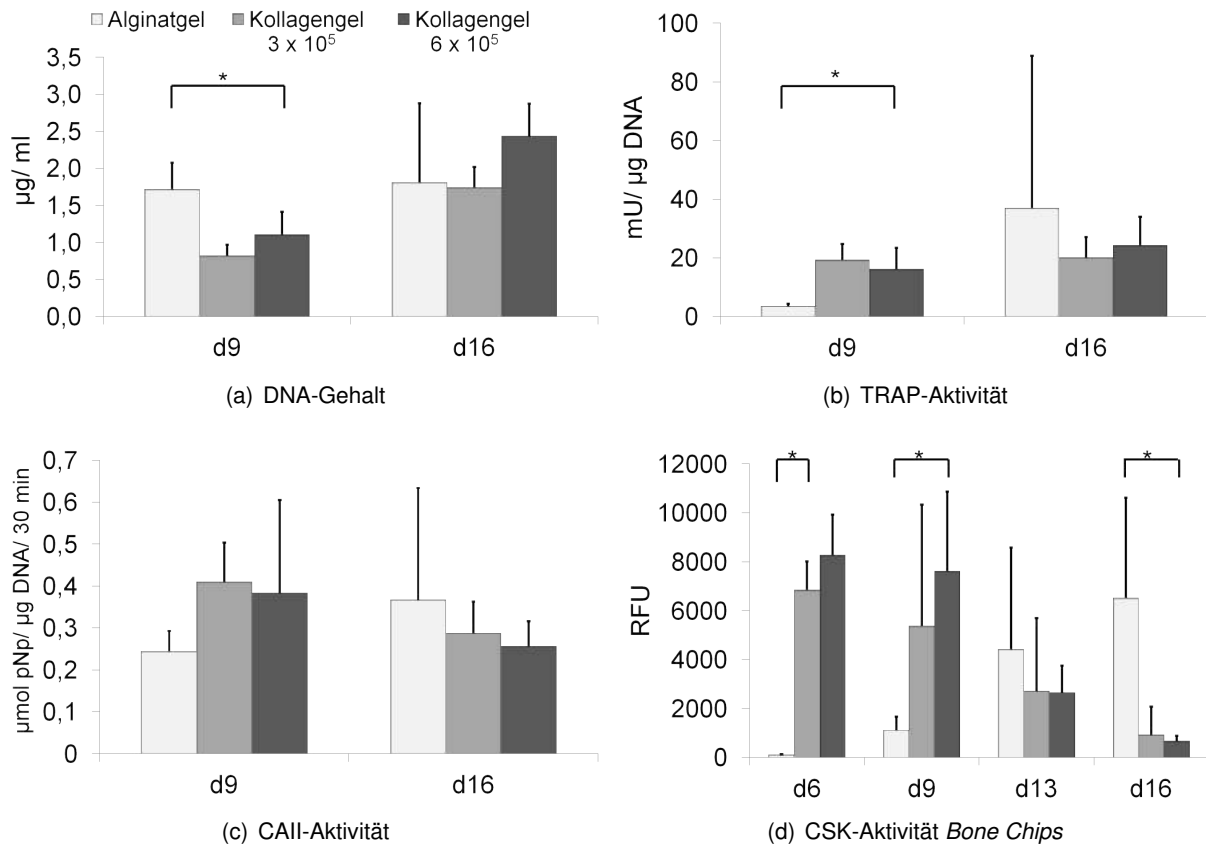


Abbildung D.7.: Osteoklastogenese von PBMC (Spender A) unter M-CSF und RANKL auf Alginategel und Kollagengel. Messdaten des DNA Gehaltes sowie der TRAP- und CAII-Aktivitäten mit je n=4 für d9 und n=5 für d16, CSK-Aktivitäten mit n=5 für jeden Zeitpunkt, Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen, *p<0,05.